

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Extracción, Purificación Parcial y Secado de la Enzima Bromelina
Obtenida a partir del Corazón de la Piña (*Ananas comosus*)”.

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERAS DE ALIMENTOS

Presentada por:

Carmina Stefania Quinde Fuentes

Nancy Viviana Sánchez Lluquín

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año 2013

AGRADECIMIENTO

A Dios, a la Virgen María y a mis padres que han sido el reflejo para que yo pueda ser una persona responsable y dedicada en mis estudios.

A mi compañera de tesis y amiga, Viviana Sánchez por su empeño, paciencia y dedicación en este trabajo.

A la Ing. Priscila Castillo por su guía, conocimiento y experiencia. De igual manera al Ph.D Oscar Navarrete, Ph.D Juan Manuel Cevallos e Iván Chóez por su valiosa colaboración.

Stefania

AGRADECIMIENTO

Mi mayor agradecimiento es a Dios mi creador, a mi familia quienes me han criado con principios y valores.

A la Ing. Priscila Castillo por su dedicación y guía para la realización de nuestra tesis, a Ph. D. Juan Manuel Cevallos, Ph.D. Oscar Navarrete, Ing. Ma. Fernanda Quijano e Ing. Iván Chóez, por colaborar en los diferentes pasos de este proyecto.

Y mi especial agradecimiento a mi amiga y compañera de Tesis Stefania Quinde, quien con su paciencia ha sido más que un apoyo durante toda mi vida universitaria.

Viviana

DEDICATORIA

A Dios ya que todos los días me da fuerza para poder dar lo mejor de mí.

A mi familia, en especial a mis padres por estar siempre conmigo, dándome su amor, apoyo y consejo invaluable.

A todos mis profesores que con su enseñanza y dedicación tendrán una excelente profesional. Y por último pero no menos importante, a mis amigos, con los que compartí una etapa grande en mi vida.

Stefania

DEDICATORIA

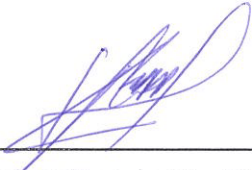
A Dios, por ser el motor y eje principal de mi vida, que me ha guiado por el buen camino y permitirme culminar mis estudios.

A mis padres, Nancy y Carlos y hermanos Carlos y Javier, quienes con su amor y valores fueron mi mayor apoyo e inspiración durante mi carrera, brindándome siempre las mejores oportunidades y consejos.

A mis amigas y amigos quienes fueron mi empujón y apoyo durante mi vida universitaria, brindándome alegrías y momentos inolvidables de sincera amistad.

Viviana

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Dr. Kleber Barcia V., Ph.D.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Ing. Priscila Castillo S.
DIRECTORA DE TESIS

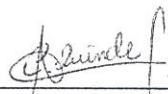


Ph.D. Juan Manuel Cevallos C.
VOCAL

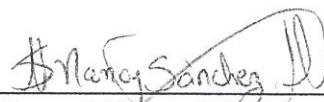
DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



Carmina Stefania Quinde Fuentes



Nancy Viviana Sánchez Lluguín

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo, la purificación parcial de la enzima bromelina mediante el sistema bifásico acuoso (SBA), evaluando el efecto del pH y las concentraciones de los componentes PEG 8000 y sales fosfato del sistema.

La bromelina fue extraída del corazón de la piña de la variedad Milagreña mediante solución buffer a 4°C con EDTA, cisteína y fosfato disódico anhídrido. El mejor resultado de purificación obtenido en el sistema bifásico acuoso fue el que consistió de 16% PEG, 18% Sal y pH 9, con un factor de purificación de 1, secándose posteriormente en un spray dryer usando goma arábica como agente encapsulante, con un rendimiento de 0.018g de extracto seco/ g de extracto purificado y un rendimiento total de 27,45 g de enzima por Kg de corazón fresco y se comprobó la presencia de la enzima bromelina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS – PAGE donde se observó una banda de proteínas de 28 kDa.

La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm, por el método de la unidad de tirosina (BTU/ ml) y la concentración de proteínas fue determinada espectrofotométricamente a una

longitud de onda de 540 nm por el método de Biuret, obteniéndose valores de actividad enzimática y concentración de proteínas de 14,64 BTU/ ml y 12,37 mg/ ml.

Se diseñó un experimento factorial 2^k por triplicado, variando concentraciones de PEG/ sal y pH, para evaluar los efectos de estas variables en estudio sobre el factor de purificación de la enzima. Como resultado se obtuvo que las concentraciones de PEG y Sal ejercen una función más importante que el pH, ya que al variar las concentraciones en el sistema variaron también los valores de coeficiente de partición de proteínas y actividad, lo que significa que la enzima fue particionada más a la fase Top. Por otro lado, el pH por sí sólo no ejerció un efecto significativo sobre la purificación, sin embargo interactuando conjuntamente con las concentraciones de PEG y sal, logró una mejor purificación en el sistema.

ÍNDICE GENERAL

Pág.

RESUMEN	I
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	VI
SIMBOLOGÍA	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO 1	 5
1. GENERALIDADES	5
1.1. Materia prima	5
1.1.1 Composición química y valor nutricional	12
1.1.2 Proteasas presentes en la piña.....	14
1.2 Bromelina	15
1.2.1 Aplicaciones de la Bromelina	17
1.3 Métodos de extracción de enzimas	18
1.4 Purificación parcial de enzimas	20
1.4.1 Sistema bifásico acuoso	21
1.4.2 Sistema PEG/ Sal	23
1.5 Método de Biuret para la concentración de proteínas	27
1.6 Método para la determinación de actividad proteolítica.....	29

1.6.1	Unidades enzimáticas	31
1.7	Secado por aspersión.....	34
1.8	Electroforesis.....	36
CAPÍTULO 2		38
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
2.1	Materiales, reactivos y equipos	38
2.2	Preparación de muestras	40
2.3	Metodología de trabajo.....	44
2.3.1	Método de extracción.....	44
2.3.2	Sistema Bifásico Acuoso.....	46
2.3.3	Determinación de proteína total	49
2.3.4	Determinación de actividad enzimática.....	52
2.3.5	Secado.....	56
2.3.6	Electroforesis SDS-PAGE	59
2.4	Metodología de cálculo.....	64
2.4.1	Coeficiente de partición.....	64
2.4.2	Actividad específica	65
2.4.3	Factor de purificación.....	66
2.5	Diseño de experimentos	66
2.5.1	Variables y niveles para pruebas experimentales	67
2.5.2	Determinación de corridas experimentales	69
CAPÍTULO 3		71
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	71
3.1	Análisis de resultados de la extracción.....	71
3.2	Análisis de resultados de sistema bifásico acuoso.....	79

3.3	Análisis del factor de purificación en los experimentos	88
3.4	Análisis de resultados de la verificación de presencia de la enzima .	94
CAPÍTULO 4		99
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	99

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

cm	Centímetro
et al.	Y otros
g	Gramo
kDa	KiloDalton
Kg	Kilogramos
nm	Nanómetro
M	Molar
mg	Miligramo
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
µg	Microgramo

SIMBOLOGÍA

°C	Grados Celsius
CM	Cuadrados medios
F	F calculado
GL	Grados de Libertad
Ho	Hipótesis nula
Hi	Hipótesis alterna
P	Valor P
SC	Suma de Cuadrados
%	Porcentaje
μ	Media aritmética

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. 1. Piña (<i>Ananas comosus</i>)	5
FIGURA 1. 2. Partes de la piña.....	7
FIGURA 1. 3. Ecuador: Producción de piña por provincias	8
FIGURA 1. 4. Piña de la variedad Cayena lisa	9
FIGURA 1. 5. Piña de la variedad Champaka F-153	10
FIGURA 1. 6. Piña de la variedad MD-2	11
FIGURA 1. 7. Piña de la variedad Milagreña	11
FIGURA 1. 8. Representación esquemática de particionamiento de biomoléculas en SBA.....	25
FIGURA 1. 9. Reacción de Biuret	28
FIGURA 1. 10. Spray dryer SD-Basic.....	35
FIGURA 2.1. (a) Corazones de piña, (b) Extracto centrifugado	46
FIGURA 2. 2. (a) Soluciones de PEG y Sal; (b) Formación del SBA.....	46
FIGURA 2. 3. Esquema de la formación del Sistema Bifásico Acuoso.....	48
FIGURA 2. 4. Espectrofotómetro	49
FIGURA 2. 5. Solución de albúmina serica bovina con reactivo de Biuret;.....	52
FIGURA 2. 6. Medición de actividad enzimática	55
FIGURA 2. 7. Bromelina seca semipurificada.....	59
FIGURA 2. 8. Secuencia del montaje del sistema de electroforesis.....	59
FIGURA 2. 9. Desarrollo de la Electroforesis.....	63
FIGURA 3. 1. Curva de calibración para proteína total.....	74
FIGURA 3. 2. Curva de calibración de tirosina	77
FIGURA 3. 3. Efecto de la concentración de sal en el Kp.....	86
FIGURA 3. 4. Efecto de la concentración de sal en pH 7 y pH 9	87
FIGURA 3. 5. Gráfica de Residuos para Factor de Purificación	91
FIGURA 3. 6. Efectos principales para Factor de purificación	92

FIGURA 3. 7. Interacción de efectos para Factor de purificación	93
FIGURA 3. 8. Proceso de obtención de Bromelina.....	95
FIGURA 3. 9. Geles de electroforesis SDS-Page	97
FIGURA 3. 10. Determinación del Peso molecular de bromelina	98

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 Clasificación Taxonómica de la Piña	6
TABLA 2 Contenido química de la piña	13
TABLA 3 Tampón de muestra.....	42
TABLA 4 Gel separador 13%.....	43
TABLA 5 Gel concentrador 4%	43
TABLA 6 Volúmenes de BSA y agua destilada.....	51
TABLA 7 Concentraciones usadas para la elaboración de la curva de tirosina .	53
TABLA 8 Parámetros del proceso de secado	57
TABLA 9 Factores y niveles del diseño de experimentos	68
TABLA 10 Corridas experimentales.....	70
TABLA 11 Rendimiento de la extracción de piña.....	72
TABLA 12 Absorbancia para curva de BSA.....	73
TABLA 13 Concentración de proteínas del extracto crudo	75
TABLA 14 Absorbancia para curva de tirosina	76
TABLA 15 Análisis de regresión: Absorbancia vs. Concentración	78
TABLA 16 Actividad enzimática del extracto crudo.....	79
TABLA 17 Composición de los sistemas bifásicos acuosos	79
TABLA 18 Concentración de proteínas de la purificación	80
TABLA 19 Actividad enzimática de la purificación	82
TABLA 20 Factor de purificación	83
TABLA 21 Resumen de resultados.....	85
TABLA 22 Factor de purificación del diseño factorial.....	89
TABLA 23 Análisis de varianza para Factor de purificación	90
TABLA 24 Concentración de proteínas del extracto seco.....	96
TABLA 25 Actividad enzimática y específica del extracto seco	97

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son moléculas orgánicas presentes en las células de organismos vivos, con una función específica de catalizar reacciones químicas, logrando así el aumento de la velocidad de una reacción química (FERRAR, 2011). Por ser económicamente viables, el empleo de enzimas en diversos sectores industriales viene creciendo desde hace varios años, entre las enzimas de interés industrial podemos citar a la bromelina

Datos actuales revelan que la producción de enzimas proteolíticas, tales como bromelina, papaína y ficina, representan el 38% del total de enzimas mundialmente comercializadas; la bromelina es una enzima obtenida a partir de la piña (*Ananas comosus*) y consiste en una cisteína-proteinasa de naturaleza ácida, presente en la corteza, raíz y fruto (PULIDO, 2007).

Esta enzima tiene importantes e innovadoras aplicaciones dentro de la biotecnología, usándose en la industria alimenticia, principalmente para formular ablandadores de carne y fabricación de cerveza y quesos, entre otros. En medicamentos, se emplea con éxito como anti-inflamatorios, anticoagulante, digestivos.

Las hojas, el tallo y corazón de la piña, representan el 55% de su peso y son considerados como desechos para los agricultores e industriales (PULIDO, 2007), por lo que solo se han ocupado de la producción de esta fruta y no de estas partes del cultivo pudiendo ser materia prima para incursionar en el mercado de la bromelina.

El desarrollo de diversas técnicas de extracción y purificación de la bromelina han sido estudiadas en principales países productores de piña, las cuales se han llevado a cabo en especies endémicas; sin embargo, no existen investigaciones con respecto a la purificación de esta enzima en el Ecuador, es por ello que se analizó el comportamiento de la bromelina presente en la especie perolera más conocida como "Milagreña".

Para el desarrollo de esta investigación, se evaluaron los efectos del pH y las concentraciones de los componentes del sistema bifásico acuoso PEG y sal como método de purificación parcial de la bromelina a partir del corazón de la piña. Se analizó el contenido de proteínas, actividad enzimática, coeficientes de partición y factor de purificación, para así poder decidir cuál es el mejor tratamiento del SBA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué efecto tienen las diferentes concentraciones y pH del sistema bifásico acuoso en el factor de purificación de la bromelina, extraída del corazón de la piña (*A. comosus*) de la especie perolera del Ecuador.

HIPÓTESIS DEL PROYECTO

Los factores de pH y concentración de los componentes PEG-Sal del sistema bifásico acuoso tienen efecto sobre el factor de purificación de la bromelina, ya que modificando estos factores alterarán la variable de respuesta, y es de suponer que el mayor factor de purificación se dará por la mejor combinación de pH y concentración.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto del pH y las concentraciones de los componentes PEG y sales fosfato del sistema bifásico acuoso utilizado en el método de purificación parcial de la enzima bromelina extraída a partir del corazón de la piña.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer y calcular los rendimientos de la enzima bromelina del corazón del fruto *Ananas comosus* de la variedad Milagreña mediante solución buffer, EDTA y cisteína.
- Medir la concentración y actividad enzimática por medio de espectrofotometría.
- Determinar el coeficiente de partición y factor de purificación resultantes del sistema bifásico acuoso.
- Diseñar un experimento factorial 2k con el fin de analizar el efecto del pH y concentración sobre el factor de purificación.
- Secar la bromelina purificada mediante el método de secado por aspersión y verificar la presencia de la enzima mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. Materia prima



FIGURA 1. 1. Piña (*Ananas comosus*)

La piña (FIGURA 1.1) es una fruta tropical que proviene de países sudamericanos, entre ellos Brasil y Paraguay. Todas las especies pertenecen a las cuencas amazónicas, siendo aquí donde se dio su domesticación. Se han señalado también como el área de origen la

cuenca superior de Panamá, entre Brasil, Paraguay y Argentina, las selvas del curso superior del Amazonas, y las regiones semisecas de Brasil, Venezuela y Guyanas (PULIDO, 2007). Es una planta de flores moradas, hojas rígidas y espinosas y su fruto es grande, carnoso y de sabor muy apreciado. Su nombre científico es *Ananas comosus*, en la TABLA 1, se puede observar su clasificación taxonómica (AVELINO *et al*, 2009)

TABLA 1
Clasificación Taxonómica de la Piña

Reino	Vegetal
Phyllium	Pteridófita
Clase	Angiosperma
Subclase	Monocotiledónea
Orden	Farinosae
Familia	Bromeliaceae
Género	Ananas
Especie	comosus

FUENTE: AVELINO *et al*, 2009

Las características principales de la planta productora de piña son: altura promedio de 1 a 2 metros en su etapa adulta, ancho de 1 a 2 metros en etapa adulta, y está formado principalmente por el tallo, la corona y sus retoños, como se muestra en la FIGURA 1.2.

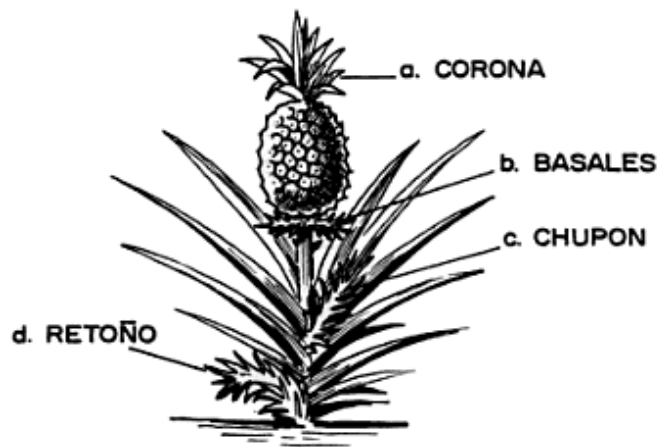


FIGURA 1. 2. Partes de la piña

FUENTE: SANCHO & COCKERELL, 1991

El fruto es generalmente cilíndrico o ligeramente cónico de 2.5 kilogramos aproximadamente, que comprende alrededor de 100-200 bayas o frutos pequeños de 2,5 centímetros de diámetro fusionados alrededor del eje central o corazón (FERREIRA, 2011).

Zonas de cultivo en Ecuador

Las principales zonas de cultivo de piña en el Ecuador están determinadas por la temperatura, lluvia, tipo de suelo y logística, al ser una fruta tropical las principales zonas que resaltan son: Guayas, seguido de Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos, Pichincha, Esmeraldas y Manabí (PROECUADOR, 2011). Las tres primeras

provincias indicadas son las que poseen mejores condiciones para la producción de piña como se puede observar en la FIGURA 1.3.

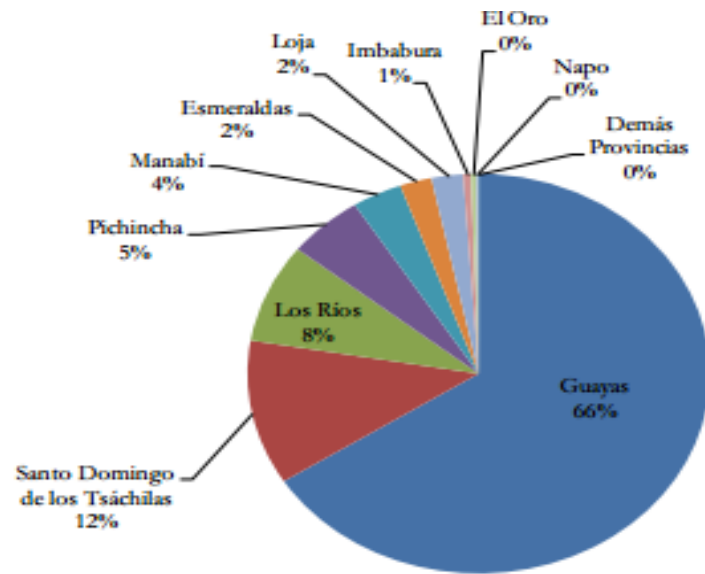


FIGURA 1. 3. Ecuador: Producción de piña por provincias

FUENTE: PROECUADOR, 2011.

Nuevas áreas pueden incluir la zona de San Carlos – Quevedo, El Empalme y Quevedo. En el sur del país se debe mencionar la zona de Santa Rosa – Arenillas. (PROECUADOR, 2011)

Variedades cultivadas en el Ecuador

La piña, de acuerdo a sus características se agrupa en 3 variedades que son:

Grupo Cayena

Dentro de este grupo se destacan variedades como:

- Cayena lisa (Hawaiana): Originaria de Guyana, muy utilizada en industrialización y exportación como fruta fresca. Su fruto es amarillo al alcanzar la madurez (FIGURA 1.4) y generalmente presenta una corona sencilla (MORENO, 2008).



FIGURA 1. 4. Piña de la variedad Cayena lisa

- Champaka F-153: Es un clon de la variedad Cayena lisa, presenta mayor resistencia a enfermedades, además de una mayor concentración de azúcar (MORENO, 2008). Es de forma cilíndrica y de pulpa amarilla, como se puede observar en la FIGURA 1.5.

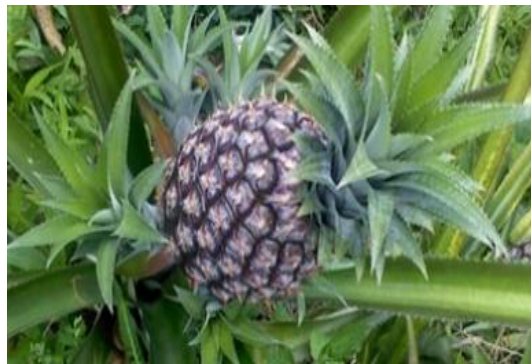


FIGURA 1. 5. Piña de la variedad Champaka F-153

Grupo Queen

- MD-2: También llamada Golden Sweet (FIGURA 1.6), es de reciente introducción. Entre sus características está la baja acidez y los altos contenidos de grados brix (14 – 18° promedio, pudiendo alcanzar en condiciones excepcionales hasta 30°). Está catalogada como una fruta de lujo en los mercados externos (MORENO, 2008).



FIGURA 1. 6. Piña de la variedad MD-2

Grupo tipo peroleras

- Milagreña: Es de la variedad Perolera (FIGURA 1.7), originaria de Brasil, se destina únicamente para el mercado local. Su fruto presenta forma de bloque, peso de 1.5 – 3.5 kg; color externo e interno amarillo; ojos prominentes con brácteas sin agujones, profundos, en número de 130 – 140, orientados en tres espirales (MORENO, 2008).



FIGURA 1. 7. Piña de la variedad Milagreña

1.1.1 Composición química y valor nutricional

La piña presenta una variación muy grande en su composición química, de acuerdo con la época en la que se produce. De manera general su producción ocurre en verano, éstas frutas presentan mayor cantidad de azúcares y menor acidez que aquellas producidas fuera de temporada, cuando la temperatura ambiente es baja (MONTILLA *et al*, 1997).

El valor nutricional de la fruta depende principalmente de sus azúcares solubles, vitaminas y sales minerales contenidas en el mismo, ya que los niveles de proteínas y lípidos son relativamente bajos. La acidez del fruto varía mucho según la variedad, el estado de maduración de la fruta y otros factores. En cuanto a la composición de los ácidos, los más comunes y abundantes son el ácido cítrico y el ácido málico (MONTILLA *et al*, 1997).

En cuanto a los azúcares, representan una fracción muy importante de la parte comestible de la fruta. Entre los azúcares predomina la sacarosa 66% y 34% de azúcares

reductores, glucosa y fructosa. Las vitaminas se encuentran presentes en gran número, aunque en pequeñas cantidades. Las cenizas, que tienen 0,4 a 0,6% de peso total, son ricos en álcalis, principalmente en potasio, le siguen el magnesio y el calcio, generalmente en partes iguales (MONTILLA *et al*, 1997).

En términos generales se presenta en la TABLA 2, la composición química de la piña.

TABLA 2
Contenido químico de la piña

Nutrientes	Unidades	Valor por cada 100 g
Energía	Kcal	45.0
Agua	g	86.0
Proteína	g	0.5
Carbohidratos	g	11.5
Lípidos	g	0.12
Fibra	g	1.2
Calcio	mg	12.0
Hierro	mg	0.5
Magnesio	mg	14.0
Sodio	mg	3.0
Potasio	mg	250.0
Fósforo	mg	11.0
Vitamina E	mg	0.1
Niacina	mg	0.3
Ácido Fólico	ug	11.0
Vitamina C	mg	20.0
Vitamina A	ug	13.0

Fuente: UTEPI, 2006

1.1.2 Proteasas presentes en la piña

Son muy numerosas las proteasas aisladas, purificadas y caracterizadas, todas ellas se distinguen por actuar escindiendo los enlaces peptídicos de las proteínas con diferente especificidad. Se agrupan por los residuos de aminoácidos presentes en el centro activo y por tanto por su mecanismo de acción, en: Serino, Cisteíno, Aspártico, Metaloproteasas (PÉREZ *et al*, 2006)

Las plantas de la familia Bromeliaceae son una fuente natural rica en cisteíno peptidasas (EC 3.4.22), la mayor endopeptidasa presente en extractos del tallo de la planta es la bromelina de tallo (EC 3.4.22.32). Mientras que la bromelina del fruto (EC 3.4.22.33) es la mayor proteinasa en el fruto (BRULLO, 2003).

Dos adicionales cisteíno proteinasas detectadas solo en el tallo son la ananaína (EC 3.4.22.31) que representa el 5% de las proteínas totales del extracto de tallo de piña. El pH óptimo tanto con sustratos sintéticos como proteicos es cercano a la

neutralidad. Ananaína no es glicosilada y está formada por una cadena proteica simple de 23,5 kDa, $pI > 10$ y la Comosaína, endopeptidasa menos abundante del extracto de tallo de piña y representa menos del 1% de las proteínas totales, se trata de una glicoproteína de 24.5 kDa y $pI > 10$ (BRULLO, 2003).

1.2. Bromelina

La mayor endopeptidasa presente en extractos del tallo de la planta es la bromelina de tallo (EC 3.4.22.32), el pH óptimo tanto con sustratos sintéticos como proteicos es amplio, la bromelina de tallo es una única cadena polipeptídica glicosilada de 24,5 kDa, con un $pI = 9,55$, que presenta una actividad máxima a $60^{\circ}C$ y pH 7,0. (BRULLO, 2003).

Mientras que la bromelina del fruto pertenece a la misma familia que la papaína (*Carica papaya* L.), tiene un amplio pH óptimo frente a sustratos proteicos y sintéticos al igual que la bromelaína de tallo como la caseína, la hemoglobina y la gelatina, el pH óptimo de actuación de la enzima sobre la caseína es de 8,3 y $70^{\circ}C$. La bromelaína de fruto es una cadena polipeptídica simple de aproximadamente 25 kDa, cuyo pH es 4,6 (BRULLO, 2003).

La enzima no está presente en las primeras etapas de desarrollo de la fruta, pero su nivel aumenta rápidamente, manteniéndose elevado hasta la madurez, donde presenta una pequeña disminución, esta es una de las ventajas del uso de las proteasas de la piña en comparación con otras proteasas vegetales, ya que tanto en la papaína como la ficina las cuales son enzimas de la papaya y del higo respectivamente solo se encuentran en niveles máximos cuando la fruta está verde, y con la completa maduración la concentración de estas proteasas prácticamente desaparece, es por esto que a pesar de la disminución de la actividad proteolítica durante la maduración, la piña es la única fruta que posee concentraciones relativamente altas de proteasas en este estado.

Diferentes partes de la planta se puede utilizar como materia prima para la obtención de bromelina: hojas, tallos, pulpa de frutas, cáscaras y residuos industriales del procesamiento de la fruta (LÓPEZ *et al*, 1996).

1.2.1. Aplicaciones de la Bromelina

La utilización de las enzimas en la industria se está haciendo cada vez más importante, siendo actualmente la industria alimenticia la que mayor volumen utiliza, de todas las enzimas conocidas y usadas actualmente, sólo unas 20 se utilizan en cantidades apreciables. Dentro de ellas, hay varias que alcanzan el suficiente interés industrial como para ser comercializadas en los mercados de materias primas (LÓPEZ *et al*, 1996).

Las enzimas presentan la ventaja de que pueden aumentar el nivel de producción de alimentos, con un control exacto del producto final y una disminución de los residuos. Hay varias enzimas de plantas que por el momento no resulta rentable reemplazar por enzimas similares procedentes de microorganismos, como son las sulfidril-proteasas, dentro de las que están la papaína, la ficina y la bromelina. Además, en los últimos años se ha hecho evidente que las proteasas presentes en las plantas son una fuente única para el estudio de las enzimas proteolíticas (LÓPEZ *et al*, 1996).

En alimentación se utiliza la bromelina como ablandador de carnes, en la fabricación de quesos, en la preparación de alimentos infantiles y los suplementos dietéticos y en el pre tratamiento de la soya, en el tratamiento de pescados y otros productos marinos como la producción de salsa de ostras, en la fabricación de galletas (para la eliminación del gluten), como sustituto de los sulfitos empleados para impedir el pardeamiento de los jugos de frutos y del vino blanco y para la clarificación de la cerveza se usa la bromelina también en el tratamiento del cuero, en la industria textil, en el tratamiento de la lana y seda (LÓPEZ *et al*, 1996).

En la industria farmacéutica se emplea en el tratamiento de trastornos digestivos, inflamaciones, infecciones, en tratamientos contra la celulitis, y también en tratamientos contra el cáncer.

1.3. Métodos de extracción de enzimas

La primera etapa en la extracción de una proteína es su liberación de las células que la contienen. Como métodos de ruptura mecánica de las células vegetales se pueden mencionar: 1) trituración con arena, 2) trituración en mezclador de alta velocidad, 3) homogeneizador a pistón,

4) prensa francesa, 5) sonicación y 6) congelación con nitrógeno líquido y macerado (LLORENTE, 2000).

Para prevenir la proteólisis durante la extracción se debe utilizar algunos de los procedimientos siguientes: 1) extraer con buffer que contenga SDS (sodio dodecil sulfato), 2) extraer con TCA frío al 10 % (p/v), 3) adicionar un cóctel de inhibidores de peptidasas al buffer de extracción, 4) trabajar a baja temperatura durante períodos cortos de tiempo (LLORENTE, 2000). Lo usual es llevar a cabo los procesos de extracción a 4°C para minimizar los procesos de desnaturalización de la enzima y reducir la actividad de las proteasas. Cabe anotar que en algunos casos, la exposición de la enzima a bajas temperaturas puede dar lugar a la inactivación debido a la cristalización del solvente (GUERRERO, 2009), 5) usar buffers de pH por encima o por debajo del óptimo, 6) adicionar agentes protectores como dimetil sulfóxido (10 %, v/v) o glicerol (25 % v/v) o agentes reductores como ditioneol (1Mm), L-cisteína (5 Mm) o β -mercaptoetanol (1Mm), 7) adicionar agentes quelantes como EDTA (2 Mm) para remover cationes bivalentes que son cofactores de metalopeptidasas y de varias peptidasas serínicas (LLORENTE, 2000).

1.4. Purificación parcial de enzimas

La mayor parte de las investigaciones bioquímicas requieren la purificación, al menos parcial, de las sustancias objeto de estudio. Esto requiere generalmente un gran esfuerzo ya que una célula contiene miles de sustancias diferentes, la molécula que buscamos puede ser extremadamente inestable o encontrarse a concentraciones muy bajas (GUERRERO, 2009).

No existe un procedimiento único o un conjunto de procedimientos mediante los cuales todas y cada una de las proteínas puedan aislarse, normalmente siguen una secuencia de etapas de separación que dará como resultado un grado de purificación elevado y un alto rendimiento. El objetivo es aumentar la pureza o la actividad biológica de la proteína deseada por unidad de peso mediante la eliminación del material inactivo o de las proteínas no deseadas, mientras que al mismo tiempo se consigue un rendimiento máximo (GUERRERO, 2009).

En los procesos de purificación a gran escala, múltiples etapas pueden ser demandadas para obtener el producto en la especificación deseada. El proceso normalmente consiste de 4-6 pasos que se pueden dividir en

dos grupos. El primero está formado por el proceso de recuperación de la proteína: separación y rotura de las células, la separación de los fragmentos y la concentración de proteína. En el segundo grupo el objetivo es purificar la proteína, utilizando las etapas de aislamiento primario o tratamiento previo, purificación de alta resolución y refinamiento final (FERRARI, 2011).

1.4.1. Sistema bifásico acuoso

Los sistemas bifásicos acuosos son fáciles de aplicar, implicando dos operaciones; el equilibrio y la separación de fases. El equilibrio es rápido, dando como resultado la mezcla de los componentes que constituyen el sistema con el material que se desea purificar, y la posterior dispersión de las fases, produciendo de este modo el equilibrio en la composición de la misma y la partición (FERRARI, 2011).

Entre las principales ventajas que ofrece esta técnica de recuperación se encuentra: a) su alta eficiencia, b) factibilidad de escalamiento, c) bajos costos de inversión y operación, y d) generalmente permiten la recuperación y purificación de

compuestos biológicos en su forma nativa, lo cual es de gran valor, ya que al conservar la estructura se conserva al mismo tiempo la función específica de los mismos (BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, 2008).

El sistema bifásico acuoso puede ser usado en conjunto con otros procesos de separación sin afectar a las etapas previas o posteriores de recuperación. En los últimos años esta técnica ha adquirido auge, ya que tiene la capacidad de llevar a cabo la integración (sustitución de dos o más operaciones unitarias por una sola) e intensificación (procesamiento de mayor cantidad de material biológico utilizando equipo de la misma capacidad) de procesos (BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, 2008).

Sin embargo, a pesar de sus ventajas técnicas, las aplicaciones están todavía limitados lo que hace que el desarrollo metodológico y su adaptación a cada proceso, una tarea empírica. Generalmente conlleva la realización de experimentos factoriales completos en los cuales los parámetros de sistema (concentración de polímero y sal en el sistema asociado a la longitud de línea de corte LLC; peso

molecular del polímero utilizado, PM PEG; relación de volumen entre la fase superior e inferior, VR; pH del sistema, pH; etc.) son variados dentro de un amplio rango de valores para de esa manera determinar las condiciones que favorecen la partición del compuesto de interés hacia una fase particular del sistema. Si bien este enfoque brinda excelentes resultados generalmente incurre en gastos innecesarios de recursos y en un elevado tiempo de experimentación (BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, 2008).

1.4.2. Sistema PEG/ Sal

Un sistema bifásico acuoso se forma cuando un polímero como el polietilenglicol (PEG) se mezcla con otro como sales en concentraciones particulares. Por lo tanto, el coeficiente de partición de la proteína en un SBA depende no sólo de sus propiedades de superficie tales como la carga o la hidrofobicidad sino también de las propiedades fisicoquímicas de las dos fases formadas, las cuales pueden ser manipuladas ajustando factores como el peso molecular del polímero y las concentraciones de las sales a utilizar, fuerza iónica o pH (GUERRERO, 2009).

A menudo un sistema PEG/sal que contenga una alta concentración de sal, puede provocar la separación de fases en donde se obtiene una fase inferior rica en sal y pobre en polímero que coexiste con una fase superior rica en polímero y pobre en sal (FERREIRA, 2011).

Polietilenglicol

Es un poliéster sintético y neutro de cadena lineal o ramificada, disponible en una gran variedad de pesos moleculares, se solubilizan en agua y en diferentes solventes orgánicos. Su solubilidad en agua es atribuida a la unión de moléculas de agua a muchas o todas las moléculas en torno a la cadena de polietileno. Dicha unión ocurre a través del mecanismo de puentes de hidrógeno. Las conexiones de este tipo son relativamente débiles y pueden romperse en varias maneras (FERREIRA, 2011).

Sales: Fosfato de Potasio Monobásico y Dibásico

El fosfato monobásico de potasio, que también se conoce como fosfato potasio diácido, tiene una masa molar de 135,09g/mol y su fórmula molecular es de KH_2PO_4 (anhidro). Su cinética de

disolución en agua es lenta, siendo necesario calentar el sistema para la disolución total de sal a altas concentraciones. El fosfato dibásico de potasio anhidro tiene una masa molar de 171,18 g/mol y su fórmula molecular es de K_2HPO_4 . Presenta cinética de disolución en agua más rápida que la sal monobásica (FERREIRA, 2011).

Mecanismo de particionamiento en un sistema PEG/sal

Según RAVINDRA *et al*, 2007, en la FIGURA 1.8 se muestra la representación esquemática del mecanismo básico de particionamiento de biomoléculas en un sistema PEG/sal.

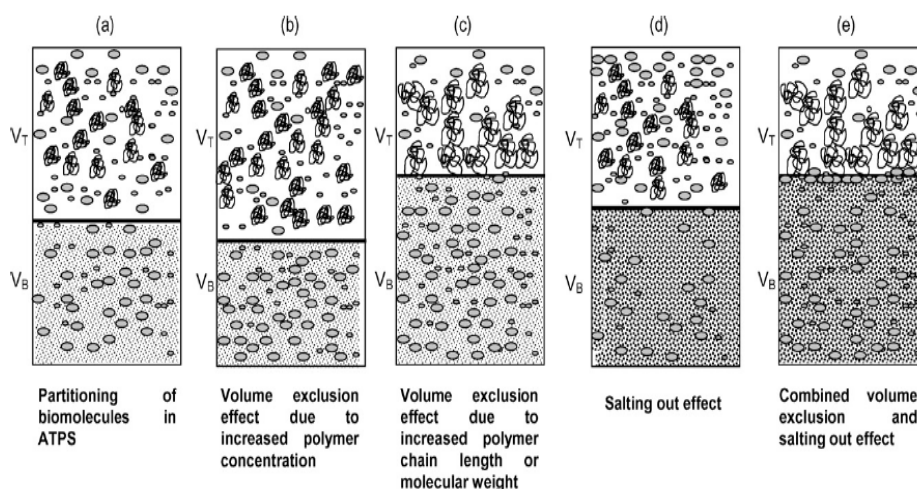


FIGURA 1. 8. Representación esquemática de particionamiento de biomoléculas en SBA

De acuerdo a la FIGURA 1.8 (a) en un sistema PEG/sal, la partición de biomoléculas depende del efecto de volumen de exclusión del polímero en la fase Top rica en polímero y el efecto del salting out en la fase inferior, rica en sal. El volumen ocupado por el polímero aumenta con el incremento de la concentración del mismo (FIGURA 1.8 b), por otro lado el incremento del peso molecular del polímero resulta en una disminución del espacio para las biomoléculas en la fase Top, y como resultado de esto las biomoléculas tienden a particionar hacia la fase inferior, lo que se define como "efecto del volumen de exclusión" (FIGURA 1.8 c). La solubilidad de biomoléculas en la fase inferior rica en sal disminuye con el aumento en la concentración de sales, lo que resulta en un incremento de la partición de biomoléculas a la fase Top y se deduce como "efecto salting out" (FIGURA 1.8 d). El sistema que comprende de una alta concentración o peso molecular de polímeros con una alta concentración de sal, resultará en la partición de biomoléculas hacia la interfase debido a la influencia tanto del volumen de exclusión como del salting out como se observa en la FIGURA 1.8.

1.5. Método de Biuret para la concentración de proteínas

El método de Biuret es la técnica más simple para la determinación de proteínas solubles. Las sustancias que contienen dos o más enlaces peptídicos forman un complejo púrpura-violeta con sales de cobre (II) alcalinas. Es posible que el color se desarrolle por la formación de un ion coordinado, tetracúprico, con dos grupos amida adyacentes (BOLAÑOS *et al*, 2003).

El desarrollo del color es diferente para cada proteína y su intensidad se puede determinar espectroscópicamente a 540 nm. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La cuantificación de la proteína se lleva a cabo con una curva patrón, utilizando el principio establecido por la ley de Beer (BOLAÑOS *et al*, 2003).

Existen pocas interferencias en esta determinación; entre ellas, la presencia del ion amonio altera el desarrollo del color; algunos pigmentos absorben a la misma longitud de onda, algunos lípidos y carbohidratos son capaces de formar complejos con el ion coordinado (BOLAÑOS *et al*, 2003).

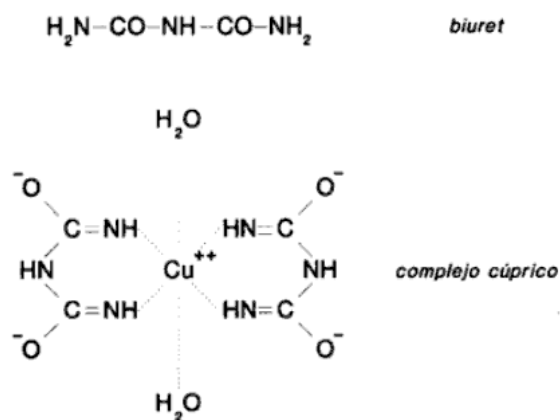


FIGURA 1. 9. Reacción de Biuret

La curva de patrón es un método de química analítica empleado para medir la concentración de una sustancia en una muestra por comparación con una serie de elementos de concentración conocida. Se basa en la existencia de una relación en principio lineal entre un carácter medible (la absorbancia en los enfoques de espectrofotometría) y la variable a determinar (la concentración). Para ello, se efectúan diluciones de unas muestras de contenido conocido y se produce su lectura y el consiguiente establecimiento de una función matemática que relacione ambas; después, se lee el mismo carácter en la muestra problema y, mediante la sustitución de la variable independiente de esa función, se obtiene la concentración de esta. Se dice pues que la respuesta de la muestra puede cuantificarse y, empleando la curva

patrón, se puede interpolar el dato de la muestra problema hasta encontrar la concentración (BOLAÑOS *et al*, 2003).

1.6. Método para la determinación de actividad proteolítica

El primer requerimiento para aislar una enzima es encontrar un ensayo cuantitativo de actividad, mediante el cual pueda valorársela convenientemente. Para decidir si un paso de la purificación tiene sentido, es necesario medir la cantidad de enzima y la cantidad de impurezas antes y después de ese paso, y comparar los resultados de varios procedimientos posibles (CALVO, 2003).

La naturaleza del ensayo dependerá del tipo de reacción que cataliza la enzima. A veces resultará conveniente la medición de la aparición de un producto y otras la medición de la desaparición de sustrato (CALVO, 2003).

Existen tres grupos generales de métodos para la determinación de la actividad proteolítica.

El primer grupo se basa en el método de Sørensen, conocido también como titulación formólica. Por este método se mide directamente la

hidrólisis de una proteína-substrato realizada por una cantidad conocida de enzima. Los substratos usuales son la caseína o la gelatina (SINCHE, 2009).

Es el más exacto, pero el menos usado debido a su poca funcionabilidad.

El segundo grupo se basa en la habilidad de la enzima para coagular la leche, conocido como el método de Balls y Hoover, este método toma como índice de actividad proteolítica, el tiempo necesario para que una cantidad conocida de enzima coagule un determinado volumen de solución de leche, y la actividad se expresa en términos de unidades de leche coagulada por g de preparado enzimático. Es un método poco reproducible e impreciso, debido a que depende del tipo de leche utilizada y de la cantidad de proteína presente en la misma (CHAVERRI, 1983).

El tercer grupo, se basa en la hidrólisis de proteínas y tiene como base el método de Anson, el cual consiste en cuantificar la cantidad de producto formado por la proteólisis enzimática de un sustrato proteico,

como la caseína y la hemoglobina. En esta técnica, se detiene la reacción de hidrólisis, mediante la adición de una solución de ácido tricloroacético (TCA) a la mezcla de reacción, de modo que precipitan tanto el sustrato aun sin degradar, como la enzima, mientras que los péptidos resultantes se mantienen estables en la solución (SINCHE, 2009). El sustrato utilizado es diferente en cada método, siendo imposible la comparación de resultados de diferentes laboratorios y trabajos realizados. En este grupo, se incluye el utilizado en esta investigación, el cual consiste en medir la cantidad de tirosina liberada por minuto, a partir de un sustrato de caseína. Es uno de los métodos más usados, debido a su reproducibilidad y precisión (CHAVERRI, 1983).

1.6.1. Unidades enzimáticas

Es necesario definir una unidad enzimática arbitraria para poder expresar, en forma cuantitativa, la pureza y la actividad de las diversas fracciones obtenidas durante la purificación. La unidad enzimática se define en forma particular para cada reacción según sea conveniente (CALVO, 2003).

La acción de las enzimas se mide determinando la cantidad de sustrato consumido, de producto formado o el número de las acciones elementales realizadas por unidad de tiempo, en condiciones estandarizadas (MACARULLA, 1992).

Así, se define como unidad internacional de actividad enzimática, U, a la cantidad de enzima necesario para transformar un micromol de sustrato por minuto, a 25°C y en condiciones definidas (MACARULLA, 1992).

La actividad específica es el número de unidades internacionales por mg de proteína (U/mg proteína) o por ml de disolución (U/ml). Estas mediciones pueden realizarse sin haber conseguido la purificación completa o el aislamiento previo de la enzima.

La enzima Bromelina se encuentra en el mercado por las siguientes actividades:

De acuerdo a (MYNOTT, 1993). En unidades Rorer, unidades FIP, BTU (unidades de tirosina de la bromelina), CDU (unidades de

digestión de caseína), GDU (unidades de digestión de gelatina) o MCU (unidades de coagulación de leche). Una unidad Rorer de actividad de proteasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza un sustrato de caseína de estandarización a pH 7 y 25°C para provocar un incremento en la absorbencia de 0,00001 por minuto a 280 nm. Una unidad FIP de actividad de bromelina está contenida en la cantidad de una preparación estándar que hidroliza una preparación adecuada de caseína (controlada por FIP) bajo las condiciones estándar a una velocidad inicial tal que se libera por minuto una cantidad de péptido, no precipitado por un reactivo de precipitación de proteínas específico, que da la misma absorbencia que 1 μmol de tirosina a 275 nm. Las BTUs, CDUs, GDUs y MCUs son como se definen en la literatura, como sigue:

BTU: Una unidad de tirosina de la bromelina es la cantidad de enzima que liberará un micromol de tirosina por minuto bajo las condiciones del ensayo (por ejemplo, después de la digestión de un sustrato de hemoglobina desnaturalizada con ácido a pH 5 y 30°C).

GDU: La actividad de enzima que libera un miligramo (10^{-3} g) de nitrógeno amónico de una solución de gelatina estándar después de 20 minutos de digestión a 45°C y a pH 4,5.

CDU: La cantidad de enzima que liberará un microgramo de tirosina después de un minuto de digestión a 37 °C a partir de un sustrato de caseína estándar a pH 7,0.

1.7. Secado por aspersión

Como la mayoría de las enzimas no son estables en solución, el secado se utiliza a menudo para mejorar la estabilidad durante el almacenamiento. El secado de las enzimas se puede realizar de acuerdo con los siguientes métodos: Secado por atomización, secado al vacío, secado con bomba de calor y liofilización. La elección del método de secado depende de los parámetros de calidad de la enzima, la salida de la producción, las aplicaciones finales y el costo del secado. El diseño de un proceso de secado adecuado debe garantizar un alto nivel de retención de la actividad enzimática. En general, la actividad enzimática después del secado es una función de la composición del líquido inicial para deshidratar, los parámetros del proceso y de las

características fisicoquímicas de la enzima. Así, el secado de cada enzima se debe considerar de forma individual (VITHALRAO, 2007).

El secado por aspersión es una técnica de secado por convección que utiliza aire caliente para transferir el calor y eliminar el agua evaporada. Es un proceso de corto tiempo en el intervalo de pocos segundos, y si se agregan estabilizadores y se optimizan las condiciones del proceso, puede ser conveniente incluso para enzimas sensible de calor (VITHALRAO, 2007).



FIGURA 1. 10. Spray dryer SD-Basic.

1.8. Electroforesis

El término electroforesis se define como el fenómeno por el cual una molécula que posee carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. La velocidad de migración o movilidad a través del campo eléctrico dependerá de varios factores como son: la intensidad de dicho campo; la carga neta, tamaño y forma de las moléculas; así como la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo (MAGDELDIN, 2012).

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS – PAGE) es, sin duda, una de las técnicas más ampliamente utilizadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas.

Las proteínas tienen una carga eléctrica neta si están en un medio con un pH diferente de su punto isoelectrico y por lo tanto tienen la capacidad de moverse cuando se somete a un campo eléctrico. Las proteínas no tienen una estructura predecible como los ácidos nucleicos, y por lo tanto sus tasas de migración no son similares entre sí. No pueden migrar incluso cuando se aplica una fuerza electromotriz (cuando están en su punto isoelectrico). En estos casos, las proteínas

se desnaturalizan mediante la adición de un detergente como dodecil sulfato sódico (SDS) para separarlos exclusivamente según el peso molecular. SDS es un agente reductor que rompe los enlaces de disulfuro, la separación de la proteína en sus sub-unidades y también da una carga neta negativa que les permite migrar a través del gel en relación directa con su tamaño. Además, la desnaturalización les hace perder su estructura terciaria y por lo tanto la velocidad de migración es proporcional al tamaño y no a la estructura terciaria (MAGDELDIN, 2012).

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar este trabajo investigativo se realizaron pruebas experimentales en los laboratorios de Bromatología e Investigación y Desarrollo de la carrera de Ingeniería en Alimentos y en las áreas de Biología Molecular y Bioproductos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

2.1. Materiales, reactivos y equipos

Las piñas fueron escogidas en diferentes mercados de Guayaquil como Sauces IX, La Florida y José Mascote, con grado de madurez M0. Los reactivos agregados al jugo de piña fueron fosfato disódico anhídrido, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y cisteína para fines bioquímicos (KETNAWA *et al*, 2011).

El extracto crudo fue centrifugado en una Centrífuga refrigerada marca ThermoFisher SCIENTIFIC, Alemania. En la purificación se utilizó polietilenglicol 8000, di-Potasio dihidrógenofosfato, Potasio dihidrógenofosfato.

La medición de la concentración de proteínas se llevó a cabo en un espectrofotómetro de haz de luz simple marca Spectronic Génesis 5, con reactivo de Biuret, y para la curva de calibración se utilizó albúmina sérica bovina.

La actividad enzimática fue medida mediante el método analítico de la Unidad de Tirosina (ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION, 2012), en el espectrofotómetro anteriormente mencionado. Como sustrato se utilizó caseína de leche bovina. Para la preparación de la enzima y del sustrato se utilizó fosfato disódico anhídrido grado analítico, L – cisteína para fines bioquímicos, EDTA grado analítico, ácido cítrico monohidratado, ácido tricloroacético (TCA) 30% grado analítico. Para la elaboración de la curva de calibración de tirosina se utilizó L – tirosina para fines bioquímicos y ácido clorhídrico 0.1N.

La microencapsulación se llevó a cabo en un secador por aspersión marca SD Basic de LabPlant y se utilizó como agente encapsulante goma arábica de grado alimenticio.

Por último se realizó la electroforesis SDS – PAGE (MALDONADO & JORRÍN, 2007) en el equipo Mini-PROTEAN 3, utilizando micropipetas de 1000, 200, 100 y 10 ul con puntas desechables, tubos eppendorf de 2 ml; los distintos reactivos fueron TEMED (Tetrametiletilenediamina), tris base, ácido clorhídrico, sodio-dodecilsulfato (SDS) al 10%, acrilamina-bisacrilamida al 30%, persulfato de amonio (APS), azul de bromofenol, glicerol, glicina, 2- mercaptoetanol, ácido acético, isopropanol, proteína estándar de peso molecular conocido (Bromelina) y coomassie brilliant blue R- 250.

2.2. Preparación de muestras

Sistema Bifásico Acuoso

El sistema bifásico acuoso descrito a continuación se realizó según WABISZCZEWICZ, 2000.

- Preparación de PEG de peso molecular 8000 con concentración de 50% (p/p) :

Para una solución de 100 g, se pesa 50 g de PEG que es disuelto en 50 g de agua destilada.

- Preparación de la solución tampón fosfato pH 7 con concentración de 40% (p/p):

Para una solución de 100 g, se pesa 14 g de fosfato de potasio monobásico y 26 g de fosfato de potasio dibásico que es disuelto en 60 g de agua destilada. Enseguida se verifica el pH de la solución.

- Preparación de la solución tampón fosfato pH 9 con concentración de 40% (p/p):

Para una solución de 100 g, se pesa 1.67 g de fosfato de potasio monobásico y 38.33 g de fosfato de potasio dibásico que es disuelto en 60 g de agua destilada. Enseguida se verifica el pH de la solución.

Soluciones para electroforesis SDS-PAGE

Las siguientes soluciones fueron realizadas según MALDONADO & JORRÍN, 2007.

▪ **Tampón de la muestra.**

Las muestras correspondientes al extracto semipurificado seco obtenidas mediante el sistema bifásico acuoso y a la bromelina obtenida comercialmente como muestra estándar, fueron disueltas en el tampón de la muestra cuya composición se indica a continuación en la TABLA 3.

TABLA 3

Tampón de muestra

Tris HCl 0,5M pH 6,8	1,25 ml
Glicerol	2,5 ml
SDS 10%	2 ml
Azul de Bromofenol 1%	0,2 ml
Agua destilada	3,55 ml

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

▪ **Preparación de los geles.**

En los geles resultantes la concentración de poliacrilamida se incrementa en forma lineal desde la zona de siembra hacia el fondo de la placa.

Las soluciones de poliacrilamida utilizadas para la obtención de los geles en gradiente se prepararon de acuerdo a las fórmulas que se indican a continuación en las TABLAS 4 y 5.

TABLA 4
Gel separador 13%

Tris HCl 1,5M pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
Acrilamida/bisacrilamida 30%	4,5 ml
APS 10%	70 µl
TEMED	7 µl
Agua destilada	2,9 ml

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

TABLA 5
Gel concentrador 4%

0,5M tris HCl pH 6,8	1,25 ml
SDS 10%	50 µl
Acrilamida/bisacrilamida 30%	0,65 ml
APS 10%	60 µl
TEMED	7 µl
Agua destilada	3,05 ml

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

- **Tampón de electroforesis**

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean 3 durante 120 min a corriente constante (100V), empleando el buffer de reservorio 5X que contiene 15 g de Tris pH 8,3, 72 g de glicina, 5 g de SDS, esta solución será diluida cinco veces antes de usarse.

- **Solución de tinción y decoloración.**

Una vez formados los geles y completada la corrida de electroforesis ,se procederá a teñir en una solución de 0,25 g del colorante Coomassie Brilliant Blue (R-250), disueltos en 125 ml de isopropanol, 50 ml de ácido acético glacial y 325 ml de agua. Para desteñir el gel se utilizó ácido acético al 7,5 %.

2.3. Metodología de trabajo

2.3.1. Método de extracción

La extracción se realizó mediante el método de KETNAWA *et al*, 2011.

1. Las muestras se prepararon a partir del corazón de la piña que fue pelada y cortada (FIGURA 2.1. a).
2. Una vez recolectadas las muestras se procedió a lavarlas y cortarlas en pedazos pequeños de aproximadamente 2x2 cm.
3. Luego se extrajo el jugo de las muestras a temperatura ambiente (25 ± 2) ° C, y se adicionó buffer a 4°C (0.1M Tampón fosfato de sodio con cisteína 15 mM y EDTA 2 mM, pH 7) en proporción 1:1 (p/v).
4. El líquido resultante se filtró a través de tela nylon para eliminar las fibras y partículas presentes.
5. Posteriormente se centrifuga a 8000 rpm (4°C por 30 minutos) y se recolecta el sobrenadante crudo (extracto de enzima) como se observa en la FIGURA 2.1. (b).

6. Finalmente el extracto recolectado se almacena a -20°C para su posterior purificación.

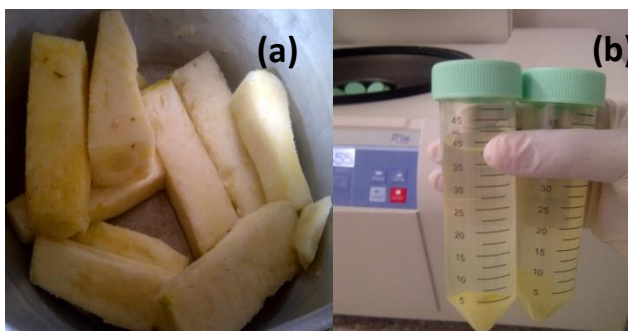


FIGURA 2.1. (a) Corazones de piña, (b) Extracto centrifugado

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

2.3.2. Sistema Bifásico Acuoso

El sistema se desarrolló según WABISZCZEWICZ, 2000.



FIGURA 2. 2. (a) Soluciones de PEG y Sal; (b) Formación del Sistema Bifásico Acuoso

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

1. El sistema fue preparado a partir de las soluciones PEG y fosfato (FIGURA 2.2. a), que fueron mezcladas a temperatura ambiente antes de pesarlas.
2. Se pesan en un tubo de centrifuga de 45 ml las cantidades requeridas de cada componente necesario para la obtención de la composición deseada (16,18% PEG 8000; 18, 16% de fosfato de potasio, 46% de agua destilada).
3. Delicadamente se agregó cada componente tratando de no molestar al anterior y se agitó en un vórtex por 45 segundos.
4. Posterior a esto se agregó 20% del extracto crudo de enzima y se volvió a agitar el sistema por 20 segundos, enseguida se procedió a centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos (FIGURA 2.2. b).
5. Se removió la fase superior usando una jeringa, absorbiendo hasta llegar a la interfaz dejando una pequeña capa antes de ésta.

6. Cambiando de jeringa se removi6 la fase inferior haciendo pasar la jeringa hasta la fase inferior y absorbiendo hasta que la interfaz se aproxima a la parte inferior del tubo.
7. Colocar cada fase en tubos diferentes y almacenar a 4°C hasta su posterior utilizaci6n.

En la FIGURA 2.3. se muestra un resumen del esquema utilizado para el desarrollo del sistema bifásico acuoso.

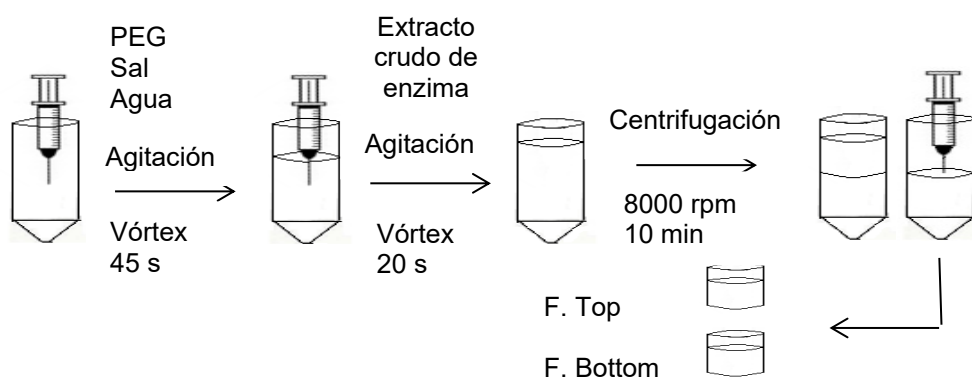


FIGURA 2. 3. Esquema de la formación del Sistema Bifásico Acuoso

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

2.3.3. Determinación de proteína total

La determinación de proteína total del extracto se realizó mediante el método de Biuret (WROLSTAD *et al*, 2005).

La absorbancia fue medida en el espectrofotómetro (FIGURA 2.4.) de la siguiente manera:

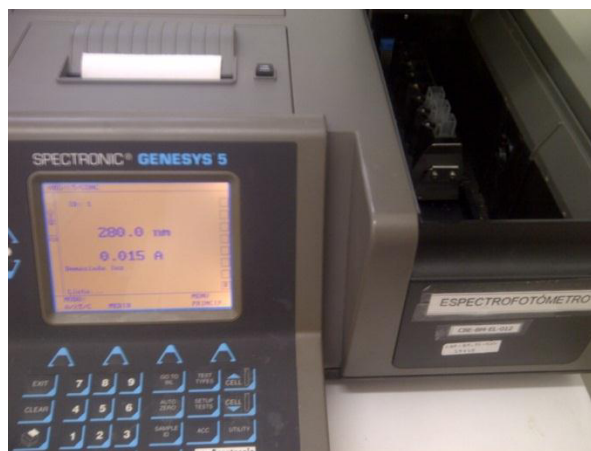


FIGURA 2. 4. Espectrofotómetro

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

1. Se selecciona la longitud de onda del máximo de absorción del compuesto a medir con el mando correspondiente (540 nm).

2. Se toma una cubeta del espectrofotómetro y se vierte en la cubeta un volumen de la solución del blanco, reactivo tal que ocupe las tres cuartas partes del volumen de la cubeta (2,5ml).
3. Se coloca la cubeta en el compartimento de cubetas del espectrofotómetro, procurando que las paredes lisas de la misma se coloquen en la dirección del haz de luz del espectrofotómetro.
4. Se realiza el ajuste del cero de absorbancia.
5. Se toma aproximadamente 2.5 ml de muestra objetivo en cada cubeta para luego medir la absorbancia del extracto crudo, extracto semipurificado y extracto seco semipurificado.

La recta de calibración de la reacción de Biuret fue obtenida de la siguiente manera:

1. Se colocan en una gradilla 10 tubos de ensayo, se adiciona a cada uno de ellos los volúmenes de la disolución patrón de albúmina de suero bovino (BSA 10 mg/ ml) y de agua destilada que se indican en la siguiente TABLA 6:

TABLA 6
Volúmenes de BSA y agua destilada

Tubo (Nº)	Albúmina patrón	Agua (ml)
1	0	2
2	0.2	1.8
3	0.4	1.6
4	0.6	1.4
5	0.8	1.2
6	1.0	1.0
7	1.2	0.8
8	1.4	0.6
9	1.6	0.4
10	1.8	0.2

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

2. A cada uno de los tubos de ensayo se añaden 3 ml de reactivo de Biuret y se agitan con el agitator (FIGURA 2.5. a y b).
3. Se introducen los tubos en el baño de agua a 37 °C, dejándose que se desarrolle el color durante 15 min.
4. Se enfrían los tubos de ensayo y se procede a medir en el espectrofotómetro con una longitud de onda a 540 nm.
5. Se ajusta el cero de absorbancia con la solución blanco exenta de proteína (tubo 1).

6. Se miden las absorbancias de los tubos 2 a 8 de la solución menos concentrada a la más concentrada.

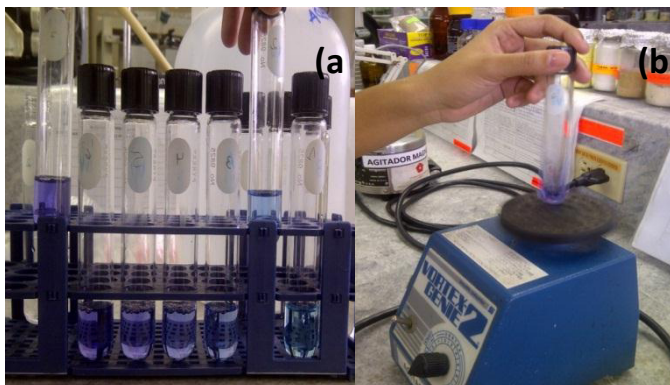


FIGURA 2. 5. (a) Solución de albúmina serica bovina con reactivo de Biuret;
(b) Mezcla de las soluciones en el vórtex.

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Una vez obtenida la recta de calibración, para conocer la concentración de proteína de la bromelina, se debe seguir el mismo procedimiento descrito anteriormente en el apartado 2.3.3, pero tomando 2 ml de bromelina con 3 ml de reactivo de Biuret; sí la muestra se encuentra en solución líquida, y cuando la muestra se encuentre en polvo se coloca 0.05 g / ml de buffer.

2.3.4. Determinación de actividad enzimática

El método analítico de la Unidad de Tirosina (BTU/ml) según ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION, 2012; fue utilizado en

este trabajo investigativo para determinar la actividad enzimática del extracto tanto crudo como semipurificado de Bromelina. Ver APÉNDICE A que explica detalladamente cómo realizar el método.

TABLA 7
Concentraciones usadas para la elaboración de la curva de tirosina

Concentración Final ($\mu\text{g/ml}$)	Dilución de la Solución Madre de Tirosina
25,0	25ml/100ml
50,0	50ml/100ml
75,0	75ml/100ml
100,0	-

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Como primer paso se realizó la curva de calibración para lo que se elaboró una solución madre con 100 mg de L-tirosina en ácido clorhídrico 0.10 N como diluyente en un matraz de 1 L y se prepararon a partir de esta disoluciones descritas en la TABLA 7, usando HCL 0.10 N como diluyente con el fin de obtener la curva de calibración de tirosina. La absorbancia se determinó en el espectrofotómetro a 280 nm, se graficó esta contra la concentración de tirosina y se determinó la pendiente.

Para la medición de la actividad enzimática se preparó sustrato de caseína, para lo cual se mezcló 2.5 g de caseína en 125 ml de la solución de fosfato disódico 50 Mm, la solución se colocó en un baño de agua que se llevó a ebullición y se mantuvo por 30 min en esas condiciones, éste se dejó enfriar a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 6.0 con solución de ácido cítrico monohidratado y por último se afora hasta 250 ml con agua destilada.

La preparación de la solución buffer de cisteína para diluir la enzima se preparó con 80 ml de agua destilada mezclando 0.71 g de fosfato de sodio dibasico anhídrido, 0.61 g de cisteína y 1.4 g de EDTA, se ajusta el pH a 6.0 con solución de ácido cítrico monohidratado, finalmente afora hasta 100 ml con agua destilada.

La FIGURA 2.6 muestra el procedimiento seguido para la medición de la actividad enzimática que consiste en dos pruebas de enzima y un blanco. En la representación se ve cómo sería en una prueba de enzima. Con respecto al blanco; la adición de enzima va junto con el TCA.

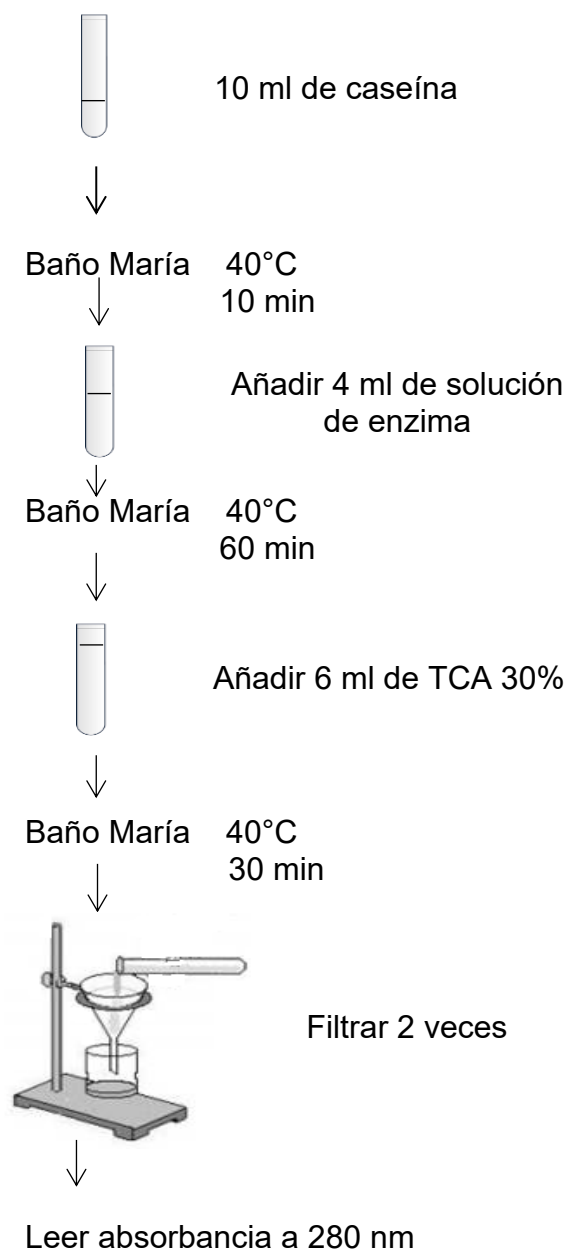


FIGURA 2. 6. Medición de actividad enzimática

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Para calcular la actividad enzimática se usó la Ecuación 1.

$$\frac{TU}{ml} = DO_{280} \times \frac{V_{total}}{(V_{enzima})(tiempo)} \times \frac{1}{pendiente} \times FD \quad Ec. 1$$

Dónde:

TU/ml: es la actividad enzimática expresada en unidades de tirosina.

DO₂₈₀: es la densidad óptica medida a 280 nm menos la densidad óptica del blanco.

V_{total}: es el volumen del sustrato, enzima y reactivo de terminación (TCA).

Tiempo: duración de la hidrólisis en minutos

pendiente: pendiente obtenida de la curva de tirosina.

FD: es el factor de dilución usado cuando los valores de absorbancia dieron valores mayores a 1.

2.3.5. Secado

El extracto semipurificado de bromelina fue microencapsulado usando goma arábica mediante un secador de aspersión con boquilla de dos fluidos (Spray Dryer SD Basic LabPlant, UK) según

ARANA & QUIJANO, 2012. Las condiciones a las que fue operado el equipo se muestran en la TABLA 8.

TABLA 8
Parámetros del proceso de secado

Temperatura de entrada del aire	65- 67°C
Temperatura de entrada de la muestra	30°C
Flujo de alimentación	3.5 ml/min.
Caudal del aire de secado	70m ³ /h
Diámetro de la boquilla de alimentación	0.5mm
Suministro de aire comprimido	50ml/min a 4 bar

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

La mezcla se realizó en una proporción 80:20, del extracto semipurificado y goma arábica respectivamente. La goma fue preparada a una concentración del 25% p/v, que fue disuelta en agua destilada previamente calentada a 70°C, una vez fría la disolución se añadió el extracto semipurificado.

El proceso de secado de la mezcla de extracto semipurificado – goma arábica se realizó como se describe a continuación:

1. Se ajustó la temperatura de entrada del aire de la columna de secado y se ajustó el caudal de la bomba peristáltica de alimentación a 3.5ml/min.
2. Una vez que la temperatura de salida alcanzó el estado estacionario, se inicia el proceso de atomización y secado de la muestra, donde se observa la caída del polvo hacia el recipiente de recolección.
3. Una vez que ha pasado toda la muestra a atomizar, se apagó el equipo y a continuación se recogió el polvo presente en el recipiente recolector. Con la ayuda de un pincel se recolectó el polvo que se encontraba adherido en el interior del ciclón.
4. El polvo obtenido (FIGURA 2.7.) fue pesado y se almacenó en congelación a -20°C en fundas de empaque al vacío.



FIGURA 2. 7. Bromelina seca semipurificada
Elaborado por: Stefania Quinde –Viviana Sánchez, 2013

2.3.6. Electroforesis SDS-PAGE

El método de electroforesis SDS – PAGE utilizado en este trabajo investigativo se lo realizó según MALDONADO & JORRÍN, 2007. Se prepararon mini-geles de 0,75 mm de espesor. Cada uno de ellos consta de un gel concentrador que contiene los pocillos para cargar las muestras, y un gel separador.

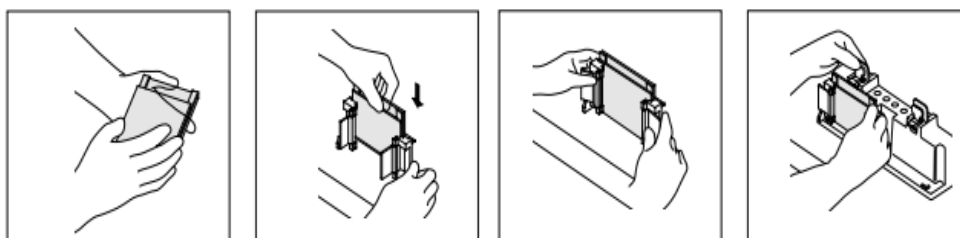


FIGURA 2. 8. Secuencia del montaje del sistema de electroforesis para la preparación de los geles.

Elaborado por: Stefania Quinde –Viviana Sánchez, 2013

Primero se limpió cada vidrio con alcohol etílico y colocando el vidrio pequeño encima del vidrio grande se los deslizó en el dispositivo de fijación como se indica en la FIGURA 2.8.

1. Se añadió el gel separador en el interior del molde hasta una altura aproximada de 2 cm del borde superior de la placa mayor, como se indica en la FIGURA 2.9 (C).
2. Con una micropipeta se añadió agua destilada, esto previene el contacto del oxígeno con el gel que inhibe la reacción de polimerización y ayuda a eliminar las burbujas. La polimerización del gel debe ocurrir en unos 30-40 minutos.
3. Se eliminó el agua destilada que cubría el gel separador, y se secó cualquier líquido restante con papel filtro con cuidado de no dañar el gel.
4. Utilizando una micropipeta se añadió el gel concentrador sobre la superficie del gel separador e inmediatamente se insertó el peine en la solución concentradora con cuidado para evitar que se formen burbujas de aire, como se indica en la FIGURA 2.9 (D, E).

5. Se esperó hasta que el gel haya polimerizado (aproximadamente 30 minutos). Se retiró el peine cuidadosamente y se enjuagaron los pocillos para eliminar cualquier resto de acrilamida.
6. En el tiempo de espera de la polimerización se prepararon las muestras de peso molecular conocido en tubos eppendorf que se van a cargar en los pocillos del gel concentrador.
7. Se insertaron las placas con los geles polimerizados en la unidad de electroforesis y se añadió el tampón de electroforesis en los reservorios interior y exterior, como se observa en la FIGURA 2.9 (F y G).
8. Se aplicaron las muestras con ayuda de una micropipeta (hasta 20 μ l) en los pocillos, y se añadió en un carril, la solución de proteínas estándar, de peso molecular conocido, FIGURA 2.9 (H, I).
9. Se conectaron los electrodos a la cubeta de electroforesis y a la fuente de alimentación y se aplica corriente eléctrica a un voltaje constante de 100-200V, como se observa en la FIGURA 2.9 (J, K).

10. Una vez acabada la electroforesis, se desconectó de la fuente de alimentación, retirándose los electrodos y sacando los geles de la cubeta de electroforesis, como se muestra en la FIGURA 2.9 (L).
11. Se sacaron los geles de acrilamida del interior del molde, se eliminó el gel concentrador, como se indica en la FIGURA 2.9 (M) y se retiró con cuidado el gel separador.
12. Se transfirió el gel a un recipiente que contenía la solución de tinción de coomassie durante una hora, FIGURA 2.9 (N).
13. Una vez teñido el gel se transfirió a la solución decolorante en agitación, hasta que sólo queden teñidas de azul las proteínas, como se indica en la FIGURA 2.9 (O).

A continuación se muestra el esquema utilizado para la realización de la electroforesis SDS – PAGE.

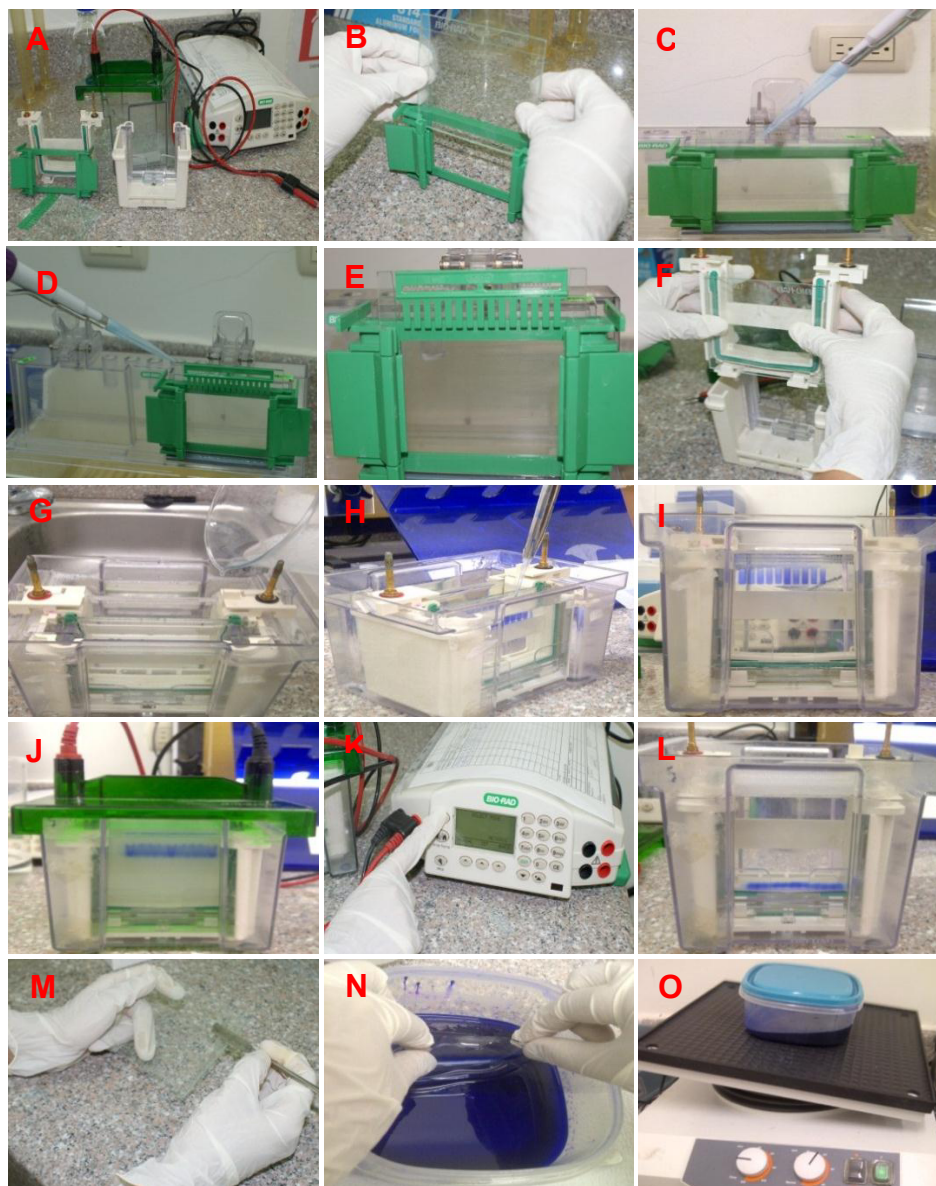


FIGURA 2. 9. Desarrollo de la Electroforesis. Material de electroforesis vertical (A); montaje del sistema (B); Preparación del gel separador (C) y concentrador (D- E); electroforesis (F- M); tinción del gel (N – O).

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

2.4. Metodología de cálculo

2.4.1. Coeficiente de partición

El coeficiente de partición (K) es un valor que representa la relación entre la concentración de la enzima en la fase superior e inferior del sistema luego de que estos hayan alcanzado el equilibrio en el mismo.

Este valor mide la eficiencia del proceso de separación de la enzima, ya que muestra su distribución en las dos fases acuosas y lo que se desea es que los dos coeficientes tengan valores muy distintos unos de otros (WABISZCZEWICZ, 2000).

Los coeficientes de partición de actividad de la bromelina (K_{act}) (WABISZCZEWICZ, 2000) fueron calculados en la Ecuación 2:

$$K_{act} = Act_t / Act_b \quad Ec. 2$$

Dónde:

Act_t : Actividad enzimática en BTU/ml de la fase top

Act_b : Actividad enzimática en BTU/ml de la fase Bottom

Similarmente el coeficiente de partición de proteína (K_{prot}) fue calculada por la ecuación 3:

$$K_{prot} = \frac{Prot_t}{Prot_b} \quad Ec. 3$$

Dónde:

$Prot_t$: Concentración de la bromelina en la fase top (mg/ml).

$Prot_b$: Concentración de la bromelina en la fase bottom (mg/ml).

2.4.2. Actividad específica

La actividad específica de una preparación enzimática se define como el número de micromoles de producto por minuto por miligramo de proteína o como el número de unidades por miligramo de enzima, si se tiene una preparación purificada, en condiciones óptimas de pH, temperatura, fuerza iónica y concentración saturante de sustratos (DE ARRIAGA, 1979), ésta fue calculada por la Ecuación 4:

$$A_{esp} = \frac{Act}{Prot} * 1000 \quad Ec. 4$$

Dónde:

Aesp: Actividad enzimática específica expresada en unidades de tirosina de bromelina por miligramo de proteína (BTU/mg).

Act: actividad enzimática, en BTU/ml

Prot: concentración de proteína, en mg/ml

2.4.3. Factor de purificación

El factor de purificación fue calculado por la Ecuación 5, que expresa cuántas veces ha sido purificada una proteína en relación con el control inicial (DÍAZ, 1996).

$$FP = (Act)_t / (Act)_i \quad Ec. 5$$

Dónde:

Act_t: Actividad enzimática (BTU/ml) de la fase top.

Act_i: Actividad enzimática (BTU/ml) del extracto crudo.

2.5. Diseño de experimentos

La metodología del diseño experimental se aplica al verificarse la influencia de cada variable y la interacción entre las variables en el

comportamiento del sistema (BRUNS, 1996). A continuación se describen los factores escogidos con sus niveles, así como la variable de respuesta.

2.5.1. Variables y niveles para pruebas experimentales

Se han seleccionado factores o variables independientes del experimento que tienen importancia en la purificación durante el sistema bifásico acuoso; variables que inciden sobre el factor de purificación, las cuales son pH y concentración.

Las variables fijas o variables controladas del experimento fueron la temperatura a 25°C y concentración de enzima en el sistema.

La variable de respuesta o variable dependiente del experimento fue el factor de purificación.

Los niveles a experimentar fueron 2, representados como nivel alto (2) y nivel bajo (1). La TABLA 9 muestra los factores y niveles del diseño experimental.

TABLA 9
Factores y niveles del diseño de experimentos

Factores	Niveles (1)	Niveles (2)
pH	7	9
Concentración PEG/Sal	18%/16%	16%/18%

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Por lo tanto, en la elaboración de este proyecto se realizó un modelo factorial 2^2 por triplicado, el cual también puede ser expresado usando el modelo de la Ecuación 6.

$$y_{k(ij)} = \mu + C_i + B_j + CB_{ij} + \varepsilon_{k(ij)} \quad \text{Ec. 6}$$

Dónde:

$y_{k(ij)}$: corresponde al valor de la variable de respuesta en la repetición k de i, j .

μ : media general del experimento.

C_i : efecto del pH i : 1,2.

B_j : efecto de la concentración j : 1,2.

CB_{ij} : efecto de las interacciones entre pH y concentración.

$\varepsilon_{k(ij)}$: error experimental en la repetición k : 1,2 de i, j .

De acuerdo al modelo de la Ec. 6 las hipótesis del experimento son:

1. Para el caso del pH

$$H_o: C_i = 0 \text{ vs } H_i: C_i \neq 0$$

2. Para el caso de la concentración

$$H_o: B_j = 0 \text{ vs } H_i: C_j \neq 0$$

3. Para el efecto de las interacciones.

$$H_o: CB_{ij} = 0 \text{ vs } H_i: CB_{ij} \neq 0$$

Para el primer y segundo caso las hipótesis evaluarán si el pH y la concentración tienen efecto sobre el factor de purificación y para el tercer caso se evaluará el efecto de la interacción entre estos factores sobre la variable de respuesta.

2.5.2. Determinación de corridas experimentales

El experimento factorial 2^2 dio como resultado 4 experimentos por réplica, haciéndose por triplicado, por consiguiente fueron 12 corridas experimentales. El orden es aleatorio con un 95% de nivel de confianza de acuerdo al programa estadístico MINITAB 14, tal y como se presenta en la TABLA 10.

TABLA 10
Corridas experimentales

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Concentración	pH
4	1	1	1	2	2
9	2	1	1	1	1
1	3	1	1	1	1
3	4	1	1	2	1
10	5	1	1	1	2
12	6	1	1	2	2
2	7	1	1	1	2
7	8	1	1	2	1
5	9	1	1	1	1
11	10	1	1	2	1
8	11	1	1	2	2
6	12	1	1	1	2

Fuente: Minitab 14

CAPÍTULO 3

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Análisis de resultados de la extracción

Rendimientos:

Se presenta a continuación en la TABLA 11 los resultados obtenidos en el rendimiento de la extracción, la cual nos indica que se procesaron 27 piñas de un peso promedio de 2.4 Kg, de los cuales se extrajeron los corazones con un peso promedio de 0.355 Kg, y así se obtuvo un rendimiento de 15.2%.

Se extrajo posteriormente 6,28 Kilogramos de jugo a partir de los 9.58 Kilogramos de corazón de piña, logrando así un rendimiento del 65.55%.

TABLA 11
Rendimiento de la extracción de piña

Número de frutos	Peso total de los frutos (Kg)	Peso del corazón (Kg)	Rendimiento (%)
1	2.9	0.42	14.5
2	2.5	0.36	14.4
3	3	0.44	14.7
4	2.5	0.37	14.8
5	2.8	0.4	14.3
6	2.8	0.39	13.9
7	2.5	0.38	15.2
8	2.9	0.4	13.8
9	2.9	0.41	14.1
10	2.1	0.35	16.7
11	1.92	0.3	15.6
12	2	0.32	16.0
13	1.92	0.32	16.7
14	2.1	0.35	16.7
15	2.4	0.36	15.0
16	2.6	0.4	15.4
17	2	0.37	18.5
18	2.1	0.36	17.1
19	1.9	0.3	15.8
20	1.8	0.31	17.2
21	2	0.28	14.0
22	2.3	0.31	13.5
23	2.4	0.35	14.6
24	2.1	0.29	13.8
25	2.4	0.36	15.0
26	1.9	0.3	15.8
27	2.8	0.38	13.6
Total	63.54	9.58	15.2
Promedio	2.4	0.355	

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Concentración:

Método de Biuret

Para poder obtener la concentración de proteínas de las diferentes muestras, se realizó la curva de calibración para proteína total mediante el método de Biuret, como se muestra en la TABLA 12.

TABLA 12
Absorbancia para curva de BSA

Concentración	Absorbancia
0	0
1	0,077
2	0,157
3	0,259
4	0,306
5	0,402
6	0,439
7	0,529
8	0,583
9	0,63

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Con los datos de la TABLA 12 se construyó la curva que se indica en la FIGURA 3.1.

De la curva de calibración se obtuvo la Ecuación 7 de la recta:

$$A = m * C + b \quad Ec. 7$$

Dónde:

A : Absorbancia

m : pendiente de la curva de calibración

C : concentración (mg/ml)

b : intersección del valor de absorbancia o del eje “y”

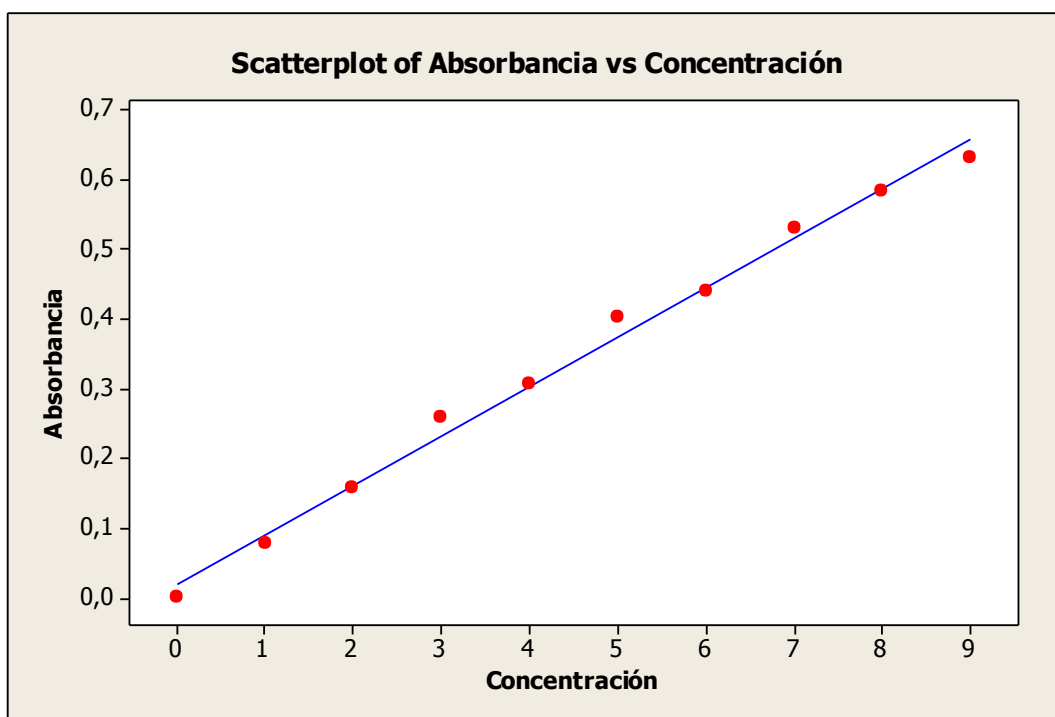


FIGURA 3. 1. Curva de calibración para proteína total

Fuente: Minitab 14

De acuerdo al APÉNDICE B, el valor de pendiente de la curva de calibración es de 0.071 el cual es significativamente diferente de cero (valor-P = 0) con un nivel de confianza del 95%.

El valor R indica el 99.3% de variabilidad de los datos, el cual es mayor al 70%, por lo tanto el modelo planteado para describir la curva de regresión es robusto.

Resultados

En la TABLA 13, se muestran los resultados obtenidos de la concentración de proteínas presente en el extracto crudo, dando así un valor promedio de 5,21 mg/ml.

TABLA 13
Concentración de proteínas del extracto crudo

Absorbancia	Concentración (mg/ml)
0,37	4,92
0,41	5,51
Promedio	5,21

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Actividad enzimática:**Curva de Tirosina**

En la TABLA 14 se muestran los resultados de absorbancia obtenidos para la elaboración de la curva de tirosina.

TABLA 14
Absorbancia para curva de tirosina

Concentración (ug/ml)	Absorbancia
25	0,176
50	0,343
75	0,522
100	0,708

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Con los datos de la Tabla 14 se construyó la curva que se indica en la FIGURA 3.2.

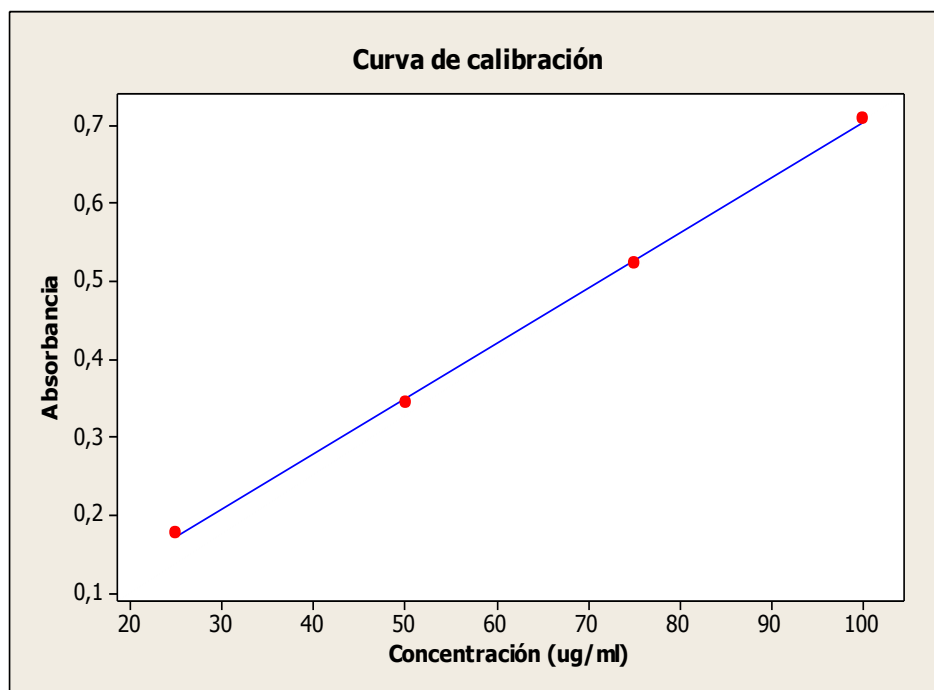


FIGURA 3. 2. Curva de calibración de tirosina

Fuente: Minitab 14

De la curva de calibración se obtuvo la Ecuación 7 de la recta:

$$A = m * C + b \quad \text{Ec. 7}$$

Dónde:

A: Absorbancia

m: pendiente de la curva de calibración

C: concentración (µg/ml)

b: intersección del valor de absorbancia o del eje “y”

Se hizo un análisis de regresión lineal entre absorbancia y concentración de tirosina, cuyos resultados se indican en la TABLA 15.

TABLA 15
Análisis de regresión: Absorbancia vs. Concentración (ug/ml)

La ecuación de regresión es:				
Absorbancia = - 0,00650 + 0,00710 Concentración (ug/ml)				
Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constante	-0,0065	0,008284	-0,78	0,515
Concentración (ug/ml)	0,0071	0,000121	58,68	0
S = 0,00676387 R-cuad. = 99,9% R-cuad.(ajustado) = 99,9%				

Fuente: Minitab 14

De acuerdo a los datos de la TABLA 15, el valor de pendiente de la curva de calibración es de 0.0071 el cual es significativamente diferente de cero (valor-P = 0) con un nivel de confianza del 95%. Además, este valor cae dentro del rango establecido por el método analítico de la unidad de tirosina, el cual indica que la pendiente debe estar dentro del rango de 0.0064 y 0.0076. El valor R indica el 99.9% de variabilidad de los datos, el cual es mayor al 70%, por lo tanto el modelo planteado para describir la curva de regresión es robusto.

Resultados:

De acuerdo a la TABLA 16, la actividad enzimática promedio del extracto crudo es de 15,15 BTU/ml y la actividad específica promedio es

de 3081,7 BTU/g. El factor de dilución para obtener BTU/ ml en la prueba 1 y 2 fue 2 y en la prueba 3 fue 4, por tanto las absorbancias salen menores en la prueba 3.

TABLA 16
Actividad enzimática del extracto crudo

Prueba	Absorbancia	Prom.	BTU/ml	BTU/g	BTU/ml Promedio	BTU/g Promedio
1	0,695	0,656	15,40	3132,64	15,15	3081,70
	0,617					
2	0,673	0,646	15,17	3084,89		
	0,619					
3	0,327	0,317	14,89	3027,58		
	0,307					

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

3.2. Análisis de resultados de sistema bifásico acuoso

En la TABLA 17, están representadas las composiciones usadas en los sistemas bifásicos acuosos PEG/Sal estudiados a lo largo de este trabajo, con diferentes pH y concentraciones.

TABLA 17
Composición de los sistemas bifásicos acuosos

Concentración	Composición total del sistema pH 7 (%p/p)				Composición total del sistema pH 9 (%p/p)			
	PEG	SAL	Agua	Enzima	PEG	SAL	Agua	Enzima
1	18	16	46	20	18	16	46	20
2	16	18	46	20	16	18	46	20

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Concentración de proteínas:

TABLA 18
Concentración de proteínas de la purificación

pH 7 [PEG 18%, Sal 16%]		
Muestra	Absorbancia	Concentración (mg/ml)
Top 1	0,188	2,38
Bottom 1	0,032	0,18
Top 2	0,152	1,87
Bottom 2	0,031	0,17
Top 3	0,361	4,82
Bottom 3	0,029	0,14
pH 7 [PEG 16%, Sal 18%]		
Top 1	0,955	13,18
Bottom 1	0,033	0,20
Top 2	0,314	4,16
Bottom 2	0,022	0,04
Top 3	0,316	4,18
Bottom 3	0,031	0,17
pH 9 [PEG 18%, Sal 16%]		
Top 1	0,837	11,52
Bottom 1	0,036	0,24
Top 2	0,881	12,14
Bottom 2	0,039	0,28
Top 3	0,974	13,45
Bottom 3	0,041	0,31
pH 9 [PEG 16%, Sal 18%]		
Top 1	0,623	8,51
Bottom 1	0,029	0,14
Top 2	0,669	9,16
Bottom 2	0,02	0,02
Top 3	0,66	9,03
Bottom 3	0,031	0,17

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

En la TABLA 18, se puede observar los resultados obtenidos mediante el método de Biuret de las concentraciones de proteínas (mg/ml) presentes en el extracto purificado, tanto de la fase top como bottom, obteniéndose mayores concentraciones en la fase top, comportamiento que se repite en todos los casos de purificación; lo que nos indica que la mayor cantidad de bromelina se encuentra en esta fase y para este trabajo investigativo siempre la enzima se particionó en la fase top.

Actividad enzimática:

En la TABLA 19 se puede observar los resultados obtenidos de actividad enzimática (BTU/ml) del extracto purificado, mediante el método de unidades de tirosina, obteniéndose mayores valores de actividad en la fase top; valores promedio para pH 7 – concentración 1: 6,54, pH 7 – concentración 2: 5,87, pH 9 – concentración 1: 14,64, pH 9 – concentración 2: 5,92; dando una mejor actividad en pH 9 – concentración 1, lo que nos comprueba que la enzima se encuentra en la fase top para todos los sistemas; y está cumpliendo su acción.

TABLA 19
Actividad enzimática de la purificación

pH 7 [PEG 18%, Sal 16%]		
Muestras	Absorbancia promedio	Actividad enzimática (BTU/ml)
Top 1	0,243	5,71
Bottom 1	0,144	1,69
Top 2	0,351	8,24
Bottom 2	0,146	1,71
Top 3	0,242	5,68
Bottom 3	0,139	1,63
pH 7 [PEG 16%, Sal 18%]		
Top 1	0,350	8,21
Bottom 1	0,214	2,51
Top 2	0,210	4,93
Bottom 2	0,157	1,84
Top 3	0,191	4,48
Bottom 3	0,317	3,72
pH 9 [PEG 18%, Sal 16%]		
Top 1	0,735	17,26
Bottom 1	0,428	5,02
Top 2	0,715	16,79
Bottom 2	0,266	3,12
Top 3	0,421	9,87
Bottom 3	0,372	4,36
pH 9 [PEG 16%, Sal 18%]		
Top 1	0,239	5,61
Bottom 1	0,153	1,79
Top 2	0,283	6,63
Bottom 2	0,129	1,51
Top 3	0,236	5,53
Bottom 3	0,133	1,56

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2012

Factor de purificación:

TABLA 20
Factor de purificación

Factor de panificación					
pH 7 [PEG 18%, Sal 16%]					
Muestras	Actividad específica (BTU/g)	K prot	K activ	FP	FP promedio
Top 1	2400,00	12,91	3,38	0,377	0,432
Top 2	4400,00	11,00	4,82	0,544	
Top 3	1180,00	33,87	3,48	0,375	
pH 7 [PEG 16%, Sal 18%]					
Top 1	620,00	30,93	3,27	0,542	0,388
Top 2	1190,00	95,19	2,68	0,325	
Top 3	1070,00	24,55	1,21	0,315	
pH 9 [PEG 18%, Sal 16%]					
Top 1	1500,00	47,84	3,43	1,139	0,966
Top 2	1380,00	42,89	5,38	1,108	
Top 3	730,00	43,22	2,26	0,652	
pH 9 [PEG 16%, Sal 18%]					
Top 1	660,00	59,81	3,13	0,370	0,391
Top 2	720,00	591,00	4,40	0,438	
Top 3	610,00	52,98	3,54	0,365	

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2012

De acuerdo a la TABLA 20 se puede observar los resultados obtenidos del factor de purificación del extracto purificado, obteniéndose valores similares en cada sistema de purificación a excepción del sistema con pH 9 – concentración 1 que tuvo el mayor factor de purificación, con un valor promedio de 0,966, lo que nos indica que ha sido purificada una vez.

Efecto de las concentraciones de PEG y Sal

PEG 8000

El comportamiento de la bromelina en un sistema bifásico acuoso de distintas concentraciones de PEG 8000 16% y 18% ha sido estudiado.

En la TABLA 21 se muestra que los coeficientes de partición K_{prot} de la bromelina obtenida en todos los sistemas bifásico acuoso fueron mayor que 1, indicando que la mayoría de las proteínas se hallan en la fase superior o top, en cambio los valores de K_{act} mayores a 1 nos indica que sólo la enzima objetivo fue encontrada en la top fase (RAVINDRA *et al*, 2007).

TABLA 21
Resumen de resultados

Sistema	K prot	K activ	AE (BTU/g)	FP
Ph7 [] 1	19,26	3,89	2660,00	0,432
Ph7 [] 2	27,74	2,39	960,00	0,388
Ph9 [] 1	44,65	3,69	1203,33	0,966
Ph9 [] 2	56,40	3,69	663,33	0,391

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

De acuerdo a la Tabla 21, el factor de purificación aumenta conforme aumenta la concentración de PEG, ya que particiona la bromelina hacia la top fase comparada con las demás proteínas repartidas en la bottom fase (KETNAWA, 2011). Por lo tanto, de todos los sistemas probados, los que constan de PEG 18% tienen factores de purificación más altos de 0,432 y 0,966, comparado con los de PEG 16% que presentan factores de purificación más bajos de 0,388 y 0,391; esto se debe a que mientras mayor es la concentración de polímero en la fase superior del sistema, aumentará la hidrofobicidad de la fase superior y al ser la bromelina una enzima hidrofóbica tendrá mayor afinidad hacia esta fase (BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, 2008).

Sal

En la FIGURA 3.3 se muestra el efecto de la sal a distintas concentraciones de 16% y 18% y según los resultados de este estudio, el K_P tuvo un rango de 19,26 a 56,4. Se tomaron en cuenta todos los valores obtenidos en la purificación y se exceptuaron solo los valores que fueron aberrantes.

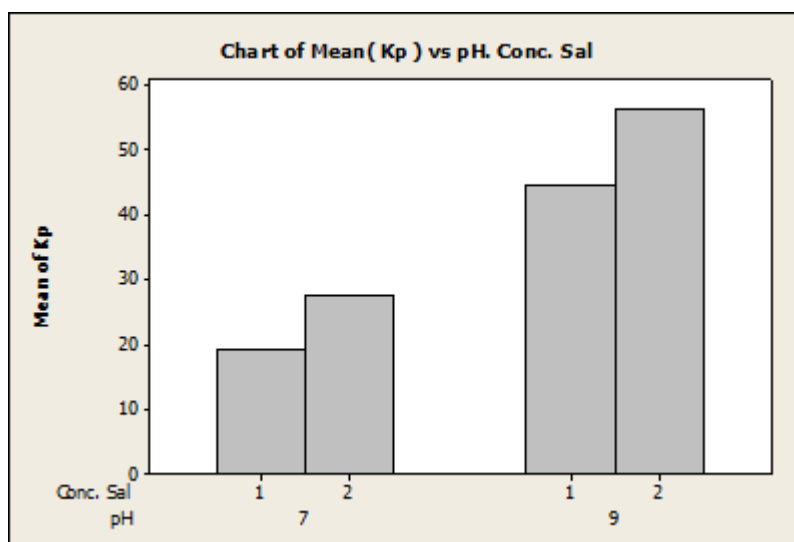


FIGURA 3. 3. Efecto de la concentración de sal en el K_P

Fuente: Minitab 14

El incremento de K_P se debe al aumento de la concentración de sal en el sistema, este fenómeno puede ser explicado debido al efecto del salting out en el que las sales son las responsables de modificar las propiedades de superficie de la enzima haciéndola más hidrofóbica y como consecuencia la bromelina y otras proteínas impuras migrarán

hacia la top fase rica en PEG; por lo cual, resulta en una disminución de la actividad específica y factor de purificación como se puede observar en la FIGURA 3.4. Sin embargo, un mayor aumento en la concentración de fosfatos hace que la proteína reduzca su solubilidad y por el contrario precipite en la fase inferior.

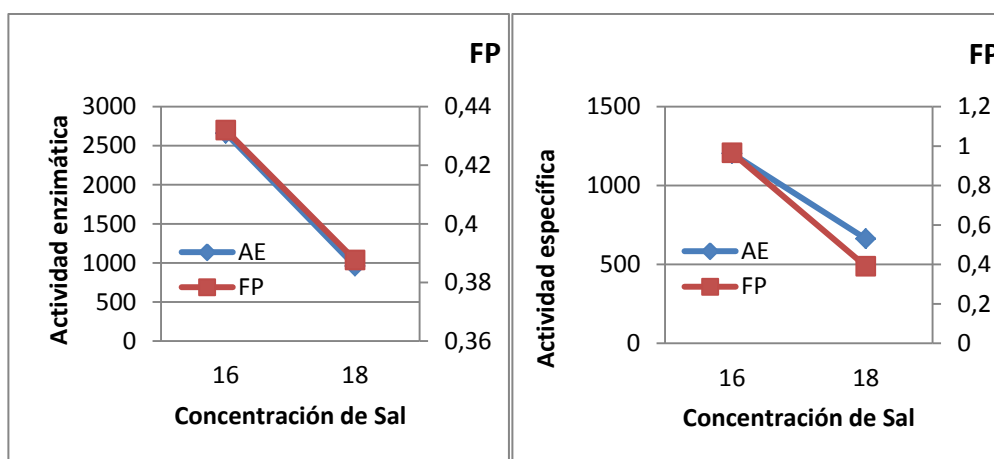


FIGURA 3. 4. Efecto de la concentración de sal en pH 7 y pH 9

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Efecto del pH

De acuerdo a las TABLA 21, el aumento en el pH del sistema mostró tener un efecto significativo sobre el comportamiento de partición de la bromelina en el sistema bifásico acuoso, ya que está íntimamente relacionado con la carga electroquímica superficial de la molécula de la

enzima. A mayor pH, la proteína cargada negativamente será enriquecida a la fase superior que está cargada positivamente, mientras que a bajo pH, la proteína se cargará positivamente y se irá a la fase inferior, por lo tanto, el coeficiente de partición de la proteína aumenta con el aumento del pH. (BENAVIDES *et al*, 2008).

En la FIGURA 3.3 mostrada anteriormente, se puede observar coeficientes de partición de 19,26 y 27,74 a pH7, valores que aumentan a 44,65 y 56,4 conforme el pH se incrementa a 9.

3.3. Análisis del factor de purificación en los experimentos

Validación estadística para el diseño experimental 2^k

Tabla de datos y resultados

En la TABLA 22 se muestran los resultados de Factor de purificación obtenidos del diseño de experimentos.

TABLA 22
Factor de purificación del diseño factorial

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Concentración	pH	FP
4	1	1	1	2	2	0,365
9	2	1	1	1	1	0,377
1	3	1	1	1	1	0,544
3	4	1	1	2	1	0,697
10	5	1	1	1	2	1,139
12	6	1	1	2	2	0,37
2	7	1	1	1	2	1,108
7	8	1	1	2	1	0,325
5	9	1	1	1	1	0,375
11	10	1	1	2	1	0,296
8	11	1	1	2	2	0,438
6	12	1	1	1	2	0,652

Fuente: Minitab 14

Como se puede observar en la Tabla 22, existe un cambio en el Factor de purificación según la combinación de factores y niveles del experimento, pero no se conoce si ese cambio es estadísticamente significativo y si realmente existe interacción entre los factores.

Análisis estadístico: ANOVA

En el APÉNDICE C se muestra resultados del análisis estadístico anova en Minitab 14. La tabla ANOVA (TABLA 23) particiona la variabilidad del Factor de purificación en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto

comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

TABLA 23
Análisis de varianza para Factor de purificación

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Concentración	0,24197	1	0,24197	7,15	0,028
B:pH	0,17715	1	0,17715	5,23	0,051
AB	0,25463	1	0,25463	7,52	0,025
Error total	0,27084	8	0,03386		
Total (corr.)	0,94458	11			
S = 0,183998 R-cuad. = 71,33% R-cuad.(ajustado) = 60,57%					

Fuente: Minitab 14

Como se muestra en la TABLA 23, la concentración y pH tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%. Por lo tanto se puede afirmar que el cambio en la concentración de los componentes PEG y Sal de un sistema bifásico acuoso para la purificación de la bromelina, si tiene efecto sobre la variable de respuesta, así como la interacción de ambos factores concentración y pH, por otro lado el cambio de pH del sistema de purificación por sí solo no ejerce un efecto sobre la variable de respuesta.

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo, así ajustado, explica el 71,33% de la variabilidad en Factor de purificación siendo este valor superior al 70%, se puede afirmar que el modelo es adecuado para este diseño experimental.

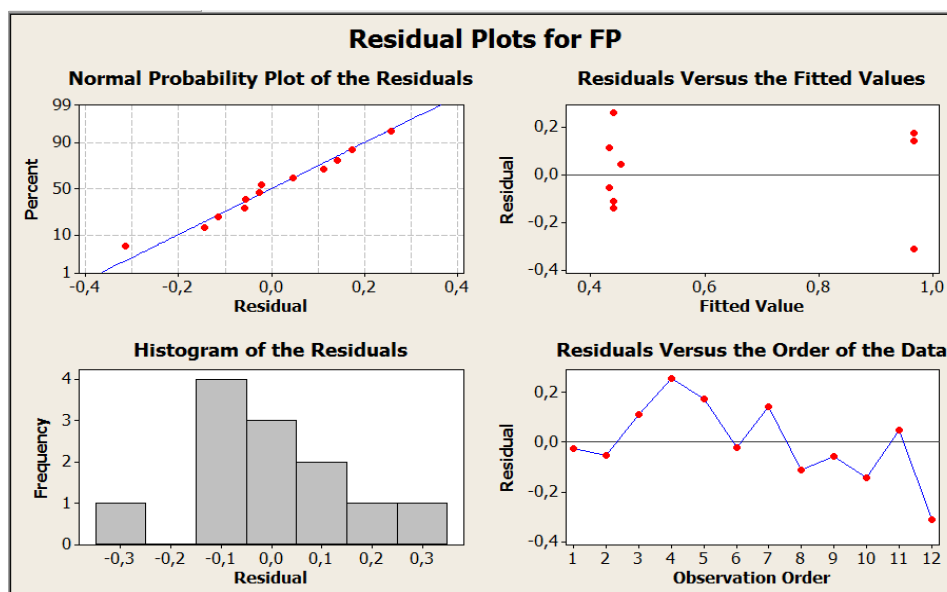


FIGURA 3. 5. Gráfica de Residuos para Factor de Purificación
Fuente: Minitab 14

La FIGURA 3.5 muestra la gráfica para los residuos. Las cuales fueron satisfactorias y no mostraron causa de preocupación, por lo tanto se cumplen con los supuestos de normalidad del error, homogeneidad de la varianza e independencia de los datos.

Interpretación de resultados

Mediante la FIGURA 3.6 se procederá a hacer un análisis de los efectos principales sobre la variable de respuesta.

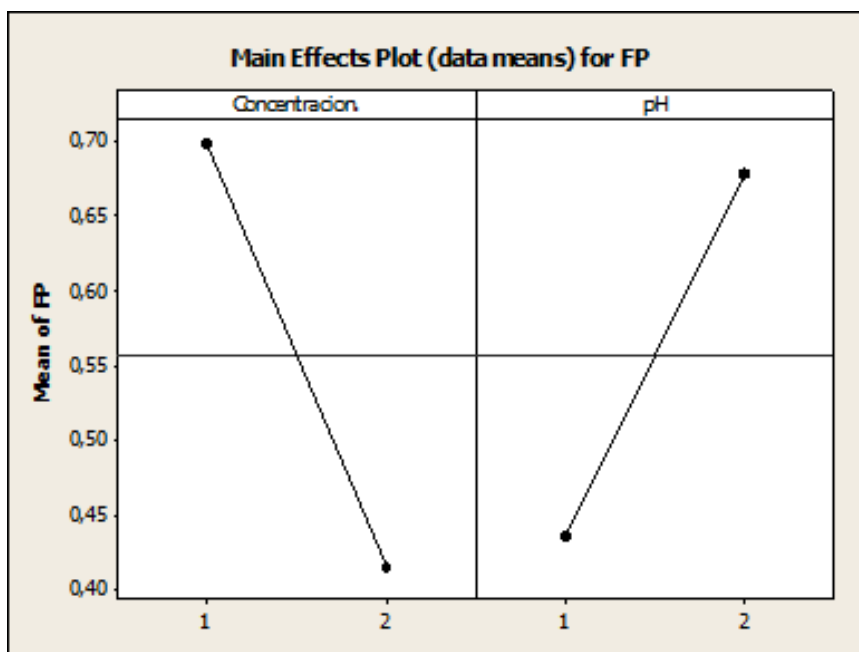


FIGURA 3. 6. Efectos principales para Factor de purificación
Fuente: Minitab 14

Se puede observar que la concentración de PEG y Sal de los sistemas tiene un efecto más grande que el pH de los sistemas experimentados, puesto que la línea que conecta las respuestas medias para los niveles de concentración 1 y 2 tiene una pendiente más abrupta que la línea que conecta las respuestas de nivel bajo y alto del pH.

Esto es debido, a que la concentración de PEG y Sal ejercen una función más importante que el pH, ya que al variar las concentraciones en el sistema varían también los valores K_{prot} y K_{act} , lo que significa que la enzima será particionada más a la fase Top; por otro lado, el pH del sistema ejerce la función de coadyudante del polímero y de la sal, por lo que solo no ejerce un efecto significativo sobre la purificación sino, interactuando conjuntamente con las concentraciones de PEG y sal, logrando así una mejor purificación en el sistema. La FIGURA 3.7 indica el efecto que tiene la interacción de los factores sobre la variable de respuesta.

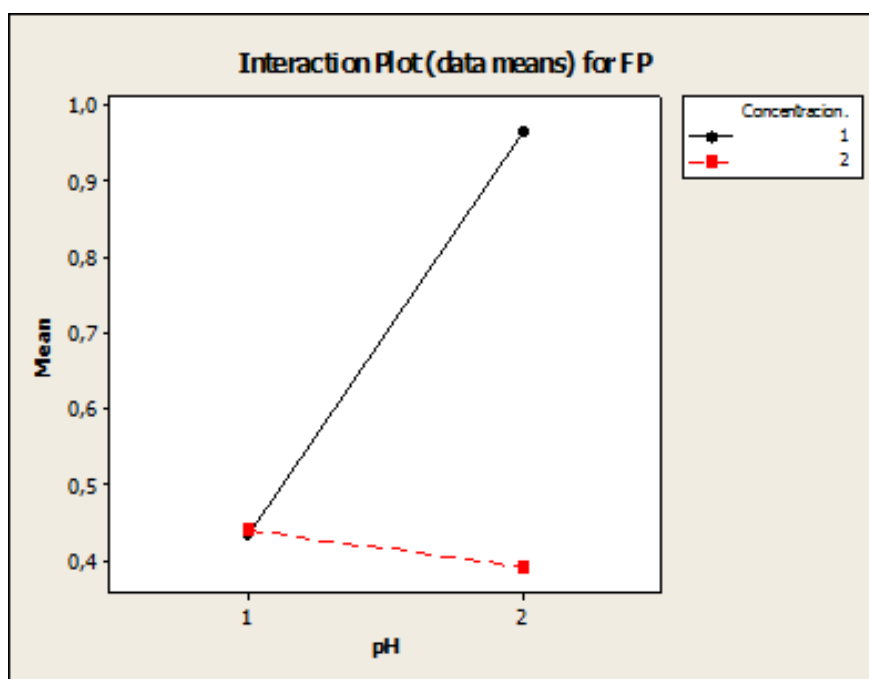


FIGURA 3. 7. Interacción de efectos para Factor de purificación
Fuente: Minitab 14

Con la finalidad de obtener un mayor factor de purificación, de acuerdo a la FIGURA 3.7 se debe usar los niveles más altos de concentración y pH, es decir: Concentración 1: PEG 18%-Sal 16% a pH 9, que darán un factor de purificación promedio de 0.966. Por esto se eligió a este tratamiento como el mejor y se procederá a su posterior secado en Spray-dryer.

3.4. Análisis de resultados de la verificación de presencia de la enzima

SECADO

Rendimiento

El rendimiento en la etapa de secado es de 0,018g de extracto seco/g extracto purificado.

En la FIGURA 3.8 se muestra un diagrama del proceso de la extracción, purificación y tratamiento de secado de la enzima para obtener 1 Kg de bromelina semipurificada, con un rendimiento de 27,45 g de enzima/Kg de corazón fresco.

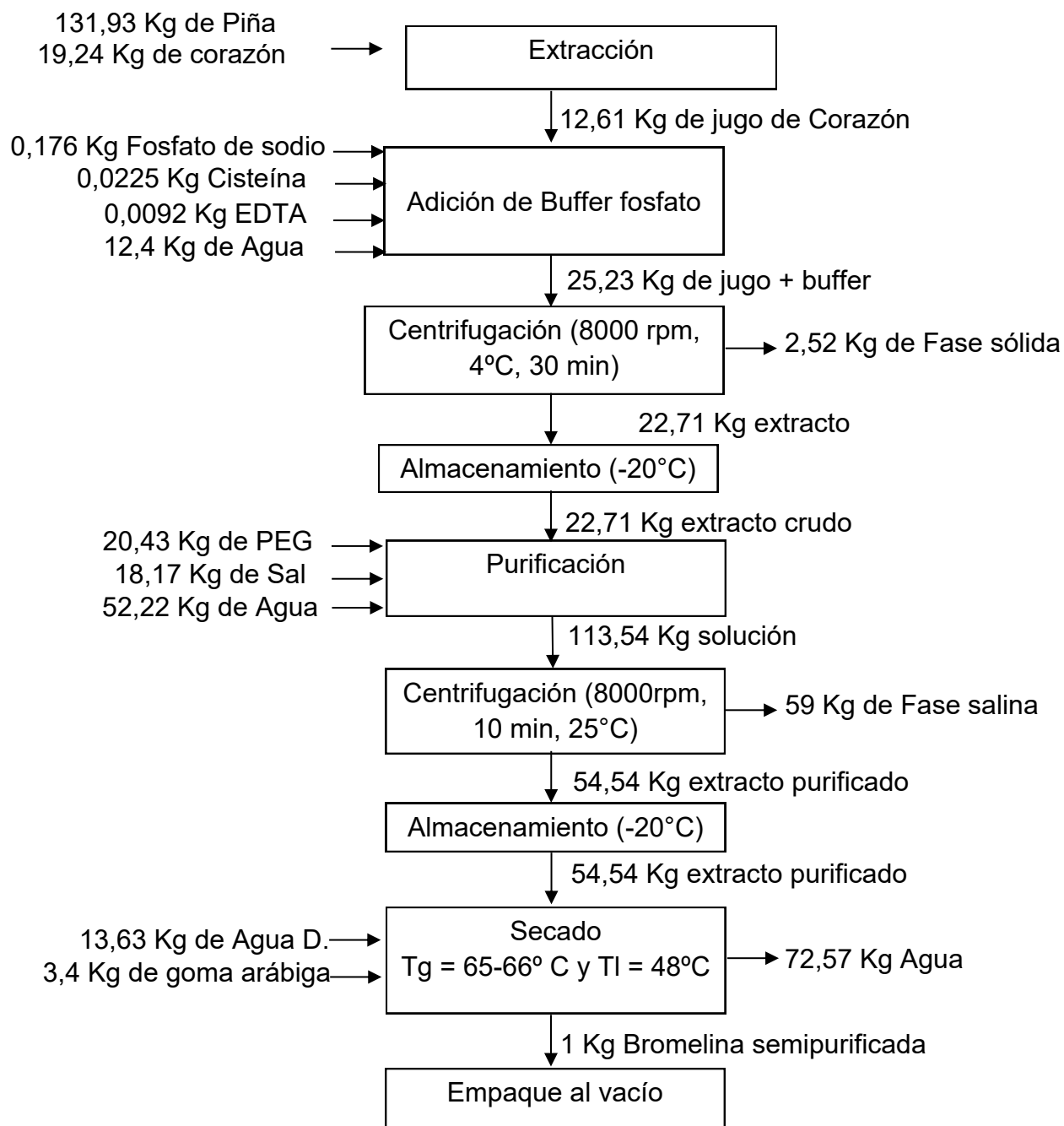


FIGURA 3. 8. Proceso de obtención de Bromelina
Elaborado por: Stefania Quinde - Viviana Sánchez, 2013

Concentración

De acuerdo a la TABLA 24, la enzima semipurificada seca tiene una concentración de proteínas de 3,27 mg/ml y con respecto a la concentración antes de secar que fue de 12,37 mg/ml; se ha reducido en un 74%.

TABLA 24
Concentración de proteínas del extracto seco

pH 9 [PEG 18%, SAL 16%]	
Absorbancia	Concentración (mg/ml)
3,21	0,247
3,33	0,255
Promedio	3,27

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

Actividad enzimática

La TABLA 25, muestra los resultados obtenidos de actividad enzimática 3,56 BTU/ml y actividad específica 1088,16 BTU/g del extracto seco. Con respecto a la actividad enzimática antes de secar ha bajado en un 75.5%.

TABLA 25
Actividad enzimática y específica del extracto seco

Prueba	Abs.	Absorbancia prom.	BTU/ml	BTU/g	BTU/ml Prom.	BTU/g Prom.
1	0,117	0,098	3,45	1055,84	3,56	1088,16
	0,079					
2	0,113	0,11	3,87	1185,13		
	0,107					
3	0,082	0,095	3,35	1023,52		
	0,108					

Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

ELECTROFORESIS

Con el propósito de determinar el peso molecular del extracto semipurificado por el sistema bifásico acuoso, se realizó una electroforesis SDS - PAGE.

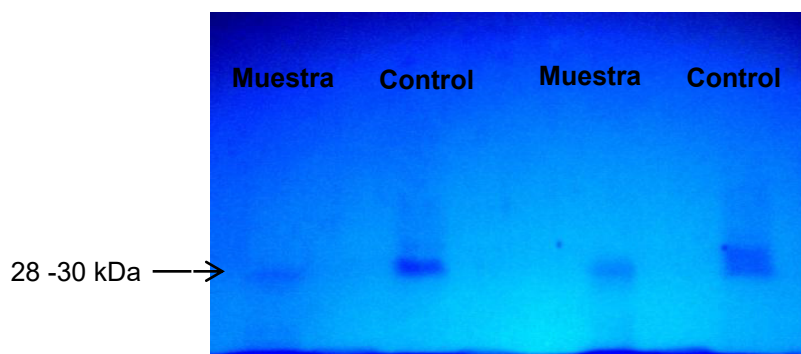


FIGURA 3. 9. Geles de electroforesis SDS-Page
Elaborado por: Stefania Quinde – Viviana Sánchez, 2013

De acuerdo a la FIGURA 3.9, la presencia de bromelina en el extracto seco semipurificado ha sido confirmada con el posicionamiento relativo de la banda leída en el gel 13% SDS-PAGE. En el gel de electroforesis, las proteínas en el extracto seco fueron identificadas como bromelina, según su movilidad ubicándose más cerca de la bromelina de marca Sigma usada como marcador, que tiene una banda de proteínas de peso molecular 28-30 kDa (KETNAWA, 2011).

Comparando bibliográficamente, la mejor purificación se da a pH 9 utilizando PEG 4000 según FERRARI, 2011; y según KETNAWA et al. 2011. El mejor factor de purificación se da con concentraciones de 18% PEG6000–17% Sal (FIGURA 3.10.); valores que son similares a este trabajo investigativo.

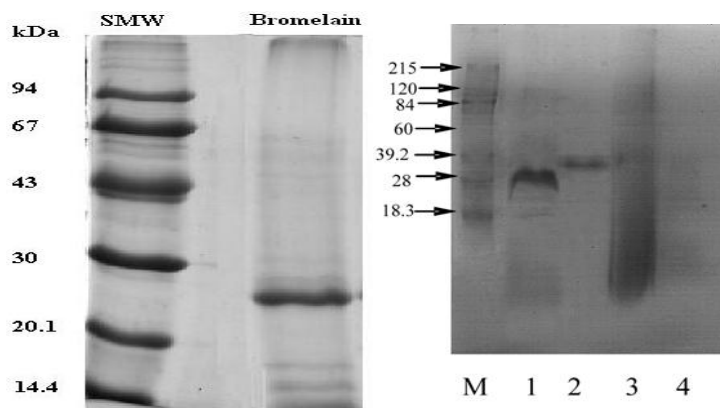


FIGURA 3. 10. Determinación del Peso molecular de bromelina por electroforesis SDS-PAGE según Ferrari y Ketnawa.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- El diseño factorial aplicado demostró que la concentración de los componentes PEG – Sal tienen un efecto significativo sobre el factor de purificación como variable de respuesta, ya que al variar las concentraciones en el sistema varían también los valores de Coeficientes de partición de proteína y actividad, lo que significa que la enzima será particionada más a la fase Top. Por otro lado, el pH del sistema ejerce la función de coadyudante del polímero y de la sal, por lo que en sí solo no ejerce un efecto significativo sobre ésta variable, sino interactuando conjuntamente con las concentraciones de PEG y sal, logrando así una mejor purificación en el sistema.

- En la etapa de extracción de los corazones de piña se obtuvo un rendimiento de 15.2%, y una vez extraído el jugo se logró un rendimiento del 65.55%.
- El factor de purificación más alto con un valor de 1 se llevó a cabo mediante la combinación de pH 9 y concentraciones de 18% PEG y 16% Sal, esto se debe a que el PEG tiene afinidad con la bromelina que es hidrofóbica y el pH 9 es próximo a su punto isoeléctrico resultando en una mejor purificación.
- En cada uno de los sistemas ensayados se obtuvieron valores de coeficientes de partición tanto de proteína como de actividad enzimática mayores que 1, lo que indica que la mayoría de las proteínas se hallan en la fase superior o top, en cambio los valores de coeficientes de partición de actividad mayores a 1 nos indica que solo la enzima objetivo fue encontrada en la top fase.
- El rendimiento de la bromelina semipurificada obtenida en la etapa de secado es de 0,018 g de extracto seco/ g extracto semipurificado, y el

rendimiento final de todo el proceso indica que para obtener 1 kg de bromelina se necesita 19,24 kg de corazón de piña.

RECOMENDACIONES

- Caracterizar y comparar los diferentes grados de maduración de la piña, estudiando su efecto en la actividad enzimática y concentración de la enzima bromelina, utilizando las distintas especies de *Ananas comosus* presentes en el Ecuador.
- Realizar ensayos para encontrar la temperatura óptima de secado modificando factores como temperatura de entrada del aire, temperatura de salida del aire, caudal de alimentación de la muestra y caudal del aire de entrada, que influyen en la actividad enzimática de la bromelina.
- Ensayar con otros tipos de secadores tales como secador al vacío, liofilizador, secador de aspersion SD- 06 y comparar resultados en cuanto a rendimientos y actividad enzimática.
- Realizar un estudio de factibilidad económica de producción a nivel industrial de bromelina.

APÉNDICE A

MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

TYROSINE UNIT (TU) ANALYTICAL METHOD

A. **Principle:** Proteolytic enzymes will hydrolyze a protein substrate with the formation of various degradation products that are amino acids using casein as a substrate, one of the amino acids found upon hydrolysis is L-Tyrosine. L-Tyrosine absorbs strongly at 280 nm and the concentration of Tyrosine as a function of optical density follows Beers' Law.

B. Equipment:

1. pH Meter
2. Constant Temperature Water Bath at $40.0^{\circ} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$
3. Analytical Balance
4. Spectrophotometer with wavelength setting at 280nm
5. Volumetric Flasks
6. Volumetric Pipettes
7. Long stemmed funnels
8. 25 ml screw cap tubes
9. Disposable culture tubes
10. Timer
11. Whatman #1 filter paper
12. Automatic Pipetters

C. Safety precautions:

1. Utilize standard laboratory safety practices.
2. Trichloroacetic acid: Gloves should be worn to avoid acid burns

D. Reagents and Reagent Preparation: Substrate, Buffer and Stopping reagent must be prepared daily. (Volumes prepared may be adjusted as needed for testing.)

1. Casein Substrate:

- a. Place a 2000 to 4000 ml beaker on the heat/stir plate.
- b. Add water and bring to a boil.
- c. Dissolve and dilute 1.775 g of anhydrous disodium phosphate with distilled water to 250 ml in a volumetric flask.

- d. Dispense 2.5 g of Calbiochem Casein (or dry weight as determined by moisture determinations for each lot of reagent utilizing the general procedure for Loss on Drying) into 125 ml of the phosphate solution made above in an appropriate size beaker (400 ml suggested) using a stir bar and mixer.
- e. Cover the solution with tinfoil.
- f. Place the Casein substrate into the Boiling water bath with constant gentle stirring for 30 minutes, making sure the water level does not reach the top of the beaker. (Weigh the Casein beaker down with another beaker filled with water to minimize movement caused by boiling.)
- g. Remove the beaker from the boiling water bath and cool to room temperature in a cool water bath with constant gentle stirring.
- h. Dissolve 1.05 g of Citric Acid Monohydrate in distilled water and dilute to 100 ml in a volumetric flask.
- i. pH the Casein substrate (original pH should be about 7.2) solution to 6.0 with the Citric Acid Solution slowly to avoid destruction of the protein matrix. (Approximately 35 ml of the acid will be needed.)
- j. Quantitatively transfer the casein to a 250 ml volumetric flask and dilute to volume with distilled water.

2. Cysteine-Versene Buffer - 2 or 4 L of the buffer may be needed based on the number of samples and the need for dilutions: To make 2 Liters:

- a. Place a 2000-ml or greater beaker with a stir bar on the magnetic mixer.
- b. Add approximately 1600-1700 ml of distilled water to the beaker.
- c. Quantitatively add:
14.20 g Anhydrous Sodium Phosphate Dibasic
12.20 g L-Cysteine
28.00g EDTA
- d. Allow all ingredients to stir until dissolved.
- e. pH the Buffer solution (original pH should be about 5.7) to 6.0 with the 1 N NaOH (approximately 20 ml will be needed.)
- f. Quantitatively transfer the buffer to a 2000 ml volumetric flask and dilute to volume with distilled water.
- g. Repeat above if more buffer is necessary.

3. Stopping Solution: (TCA): Trichloroacetic acid (30%) - 18 ml is needed for each sample to be tested.

- a. Dissolve 30 g of Trichloroacetic Acid in distilled water, quantitatively transfer to a 100 ml volumetric flask and dilute to volume with distilled water.

E. Procedure

1. Enzyme Preparation:

a. Dissolve an appropriate amount of enzyme preparation in Cysteine-Versene Buffer. Use the same buffer if serial dilutions are required. The dilution of the enzyme should be used within 30 minutes. The final dilution concentration should correspond to an absorbance of approximately 0.2600 and a concentration between 2.5 - 6.5 TU/ml.

b. Calculating Enzyme preparation:

gram weight of sample = $0.2600 \times (\text{tyrosine curve factor})$

TU/g (Target)

2. Enzyme Evaluation: Each set of tests comprises 2 enzyme tests and 1 enzyme blank. Proceed as follows:

a. Pipette 10.0 ml of the Casein substrate solution into 3 labeled 25 ml screw cap tubes, two for each enzyme test and one for the enzyme blank. (1A, 1B, and 1C... for each sample number is recommended)

b. Equilibrate the tubes for about 10 minutes at 40° C.

c. At zero time start a timer and add 4.0 ml enzyme solution to the first tube for the enzyme test. Close the tube and invert gently several times. Place in water bath at 40° C. Continue the enzyme addition at a sufficient interval (1 minute is recommended) to each tube except the enzyme blanks.

d. After exactly 60 minutes rapidly pipette 6.0 ml of TCA solution to each enzyme preparation tube. Shake vigorously and return the tubes to the water bath for 30 minutes at 40°C to complete the coagulation of precipitated casein.

e. To prepare enzyme blanks add 6.0 ml TCA solution to the Casein substrate solution followed by 4.0 ml of enzyme solution. Shake vigorously and return the tubes to the water bath for 30 minutes at 40°C to complete the coagulation of precipitated casein.

f. At the end of the 30 minute period remove each tube from the water bath and allow to cool to room temperature.

g. After cooling, filter through a Whatman #1 filter paper. (Tubes may be shaken prior to filtering to dislodge protein precipitant.) Refilter the filtrate through the same filter paper.

h. Read the absorbencies of the filtrates in a 1- cm cuvette at 280 nm using air to set the spectrophotometer to zero. Correct the A₂₈₀ value of each enzyme test by subtracting the reading of the respective enzyme blank.

3. Tyrosine curve (performed approximately every 3 months)

a. Dissolve 100 mg of L-Tyrosine in 0.10 N hydrochloric acid (HCL) and dilute to 1 L in a volumetric flask.

b. Prepare the following solutions using 0.10 N HCL as a diluent:

Final concentration

Dilution from Stock Tyrosine Solution

25.0g/ml, 25ml/100ml, 50.0g/ml, 50ml/100ml, 75.0g/ml, 75ml/100ml

- c. Determine the absorbance of the tyrosine solutions at 25.0, 50.0, 75.0 and 100.0 µg of tyrosine per ml spectrophotometrically at 280 nm in a 1-cm cell using 0.1N HCL to zero the instrument.
- d. Prepare a plot of absorbance versus tyrosine concentration.
- e. Determine the slope of the curve in terms of absorbance per µg of tyrosine. (The slope must be between 0.0064 and 0.0076)

F. Calculations:

1. Definition of Units: One unit of potency may be defined as that unit which, while acting on the specified casein substrate at the specified conditions, will produce one microgram of Tyrosine per minute.

2. The number of TU/g in a digestion mixture or in the amount of enzyme preparation contained therein is:

$$\text{O.D.} \times \text{D.F.} / 4 \times 20 / 60 \times 1 / \text{slope} = \text{TU/g}$$

O.D. = Optical Density of test minus the Optical Density of the Blank tube

D.F. = Dilution factor of Enzyme solution (1/final concentration of enzyme)

4 = Volume of Enzyme solution injected

20 = Total Volume of Substrate, Enzyme and Stopping reagent

60 = Hydrolysis duration in minutes

Slope = Slope obtained by tyrosine curve (see above)

For ease of calculation a Factor (calculation of bolded formula above) can be calculated incorporating constant volumes and the slope obtained from the tyrosine curve. (Refer to the Tyrosine curve.)

3. The number of TU per gram of an enzyme preparation is the TU activity of the preparation.

Thus: TU Activity = A₂₈₀ of filtrate x Tyrosine curve factor
enzyme conc. (g/ml)

Example: O.D. = 0.2600

Factor = 13.0

Final conc. = 0.00003600 (1/Dilution Factor)

$$\text{TU} = 0.2600 \times 13.0 / 0.00003600 = 94,000 \text{ TU/G}$$

G. Testing Accuracy Parameters:

1. Range: Absorbency readings after correction for the blank between 0.150 and 0.700 may be used to find the approximate activity of unknown preparations. Final test, however, should be made in the range of 0.200 to 0.500.
2. Duplicate tests at different levels of enzyme should not vary by more than 3%.

H. Reference:

1. A.S.B.C. PROCEEDINGS p. 225-228, Some Physical and Chemical Properties of Commercial Chillproofing Compounds, Harold E. Weissler and Adan C. Garza

APÉNDICE B

ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y VARIANZA: ABSORBANCIA VS.

CONCENTRACIÓN (ug/ml)

The regression equation is
Absorbancia = - 0,00650 + 0,00710 Concentración (ug/ml)

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-0,006500	0,008284	-0,78	0,515
Concentración (ug/ml)	0,0071000	0,0001210	58,68	0,000

S = 0,00676387 R-Sq = 99,9% R-Sq(adj) = 99,9%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	0,15753	0,15753	3443,31	0,000
Residual Error	2	0,00009	0,00005		
Total	3	0,15762			

APÉNDICE C

RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA

Multilevel Factorial Design

Factors: 2 Replicates: 3
Base runs: 4 Total runs: 12
Base blocks: 1 Total blocks: 1

Number of levels: 2. 2

General Linear Model: FP versus Concentration.. pH

Factor	Type	Levels	Values
Concentration.	fixed	2	1. 2
pH	fixed	2	1. 2

Analysis of Variance for FP, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Concentración.	1	0,24197	0,24197	0,24197	7,15	0,028
pH	1	0,17715	0,17715	0,17715	5,23	0,051
Concentración.*pH	1	0,25463	0,25463	0,25463	7,52	0,025
Error	8	0,27084	0,27084	0,03386		
Total	11	0,94458				

S = 0,183998 R-Sq = 71,33% R-Sq(adj) = 60,57%

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. ARANA, PAMELA; QUIJANO, MARÍA. “Extracción, Caracterización y Comparación de Látex Obtenido, en Secado por Aspersión, de tres Variedades de Papaya (Carica papaya L.)”. (Tesis, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, ESPOL, Guayaquil- Ecuador, 2012).
- [2]. AVELINO, W; BUENAÑO, W; SÁNCHEZ, D. “Análisis del proceso de producción de la piña para aumentar la exportación del Ecuador hacia el mercado español, aplicando las normas de calidad (ISO 14001 y EUROGAP) a partir del año 2009”. (Tesis, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil-Ecuador, 2012).
- [3]. BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Aplicación Genérica de Sistemas de dos Fases Acuosa Polietilenglicol – Sal para el Desarrollo de Procesos de Recuperación Primaria de Compuestos Biológicos. Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 7, No. 2. 2008.

[4]. BOLAÑOS, NURIA; LUTZ, GISELLE; HERRERA, CARLOS. Química de Alimentos: Manual de laboratorio. Primera edición. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 2003. Págs. 36, 37.

[5]. BRULLO, ADRIANA. “Aislamiento, purificación y caracterización de las endopeptidasas cisteínicas presentes en frutos de Pseudananas macrodontes (Morr.) Harms (Bromeliaceae)”. (Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata – Argentina, 2003).

[6]. CALVO, JUAN CARLOS. “Enzimas” Departamento de Química Biológica, [en línea]. 2003. www.calvo.qb.fcen.uba.ar/Trabajo%20con%20enzimas.htm. (Diciembre, 2012).

[7]. CHAVERRI, ALEJANDRA. “Comparación de la Actividad Proteolítica de la Papaína Secada por diferentes métodos”. (Tesis presentada para optar el grado de Licenciada en Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, 1983).

[8]. DE ARRIAGA, MARÍA DOLORES; et al. Cinética enzimática: manejo de datos. Universidad de Oviedo. Departamento de Bioquímica. Oviedo, España. 1979. Pág. 13.

[9]. DÍAZ, BELKIS; et al. Purificación y caracterización proteica de una cepa cubana del virus de la hepatitis A. Revista Cubana de Medicina Tropical. La Habana, Cuba. 1996.

[10]. ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION. “Bromelain”, [en línea].<http://www.enzymedevelopment.com/>. (Agosto, 2012).

[11]. FERRARI, JULIANA. “Extração e Caracterização da Enzima Bromelina presente no Resíduo do Curauá (Ananas Erectifolius L. SMITH)”. (Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – Brasil, 2011).

[12]. GUERRERO, CARLOS. “Inhibición de la Actividad Enzimática de la Polifenol Oxidasa Extraída del Banano (Cavendish Valery) mediante Sistemas Bifásicos Acuosos con Isoespintanol y Ácido Ascórbico”. (Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de

Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín – Colombia, 2009).

[13]. KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Aqueous Two-phase Extraction of Bromelain from Pineapple Peels ('Phu Lae' cultiv.) and Its Biochemical Properties. Food Sci. Biotechnol. 2011.

[14]. LÓPEZ, I.; DÍAZ, J.; MERINO, F. La Bromelina: Una proteasa de interés comercial. Departamento biología animal y biología vegetal. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 1996.

[15]. LLORENTE, BERTA. "Aislamiento, Purificación, Caracterización y Producción In Vitro de Peptidasas de Alcaucil Coagulantes de la Leche". (Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata – Argentina, 2000).

[16]. MACARULLA, JOSÉ; *et al.* Bioquímica Cuantitativa Volumen II: Cuestiones sobre Metabolismo. Primera edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 1992. Pág. 288.

[17]. MAGDELDIN, SAMEH. Gel Electrophoresis Principles and Basics. Primera edición. Editorial In Tech. Rijeka, Croatia. 2012. Págs. 57, 58.

[18]. MALDONADO, ANA MARÍA; JORRÍN, JESÚS V. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida: Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*, [en línea].

www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-ol/practicasgenerales.htm
(Agosto, 2012).

[19]. MONTILLA, ISABEL; *et al.* El cultivo de la Piña en Venezuela. Primera edición. Editorial IICA Biblioteca Venezuela. Maracay, Venezuela. 1997. Pág. 143-144.

[20]. MORENO, CARLOS. “Estudio de factibilidad para el establecimiento de una plantación de piña (*Ananas comosus* Var. MD-2) para exportación en Puerto Limón, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas”. (Proyecto de grado, Colegio de Agricultura, Nutrición y Alimentos, Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador, 2008).

[21]. MYNOTT, TRACEY. Uso de enzimas especialmente bromelina, en el tratamiento de diarrea no infecciosa, [en línea]. 1993. www.espatentes.com/A61/2138625.html. (Noviembre, 2012).

[22]. PÉREZ, AURORA T.; *et al.* Actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos de plantas de la familia Bromeliaceae. Revista Cubana de Plantas Medicinales. La Habana, Cuba. Vol.11. 2006.

[23]. PROECUADOR. Perfil de Piña Ecuatoriana. Instituto de promoción de Exportaciones e Inversiones. Quito- Ecuador. 2011.

[24]. PULIDO, ANALLELI. “Estudio Técnico- Económico para la Fabricación de Bromelina”. (Tesis, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, Instituto Politécnico Nacional, México D. F- México, 2007).

[25]. RAVINDRA, B.; RASTOGI, N.; RAGHAVARAO, K. Liquid–liquid extraction of bromelain and Polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. Department of Food Engineering, Central Food Technological Research Institute. India. 2007.

[26]. SANCHO, ELLEN; COCKERELL, MARCIA. Piña y Papaya. Fruticultura especial. Primera edición. Editorial EUNED. Costa Rica. 1991. Págs. 18 – 22.

[27]. SINCHE, MARCO. Aislamiento, Purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del Género *Vasconcella*. (Tesis, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional, Quito- Ecuador, 2009)

[28]. UTEPI, 2006. “Piña. Estudio Agroindustrial en el Ecuador: Competitividad de la Cadena de Valor y Perspectivas de Mercado”. Programa Integrado MICIP-ONUDI, Quito - Ecuador. 2006.

[29]. VITHALRAO, RAVIKANT. “Crystallization and Drying studies of Biomaterials” (Master of Technology Degree in Bioprocess Technology, Institute of Chemical Technology, University of Mumbai, Mumbai – India, 2007).

[30]. WABISZCZEWICZ, ANA CLAUDIA. Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi. (Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – Brasil, 2000).

[31]. WROLSTAD, RONALD; DECKER, ERIC; SCHWARTZ, STEVEN; SPORNS, PETER. Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates. Primera Edición. Editorial Wiley & Sons, Inc. 2005 Págs. 86 – 89.